

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 5/06, 5/10, A01K 67/027	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/12793 ✓ (43) Date de publication internationale: 2 mai 1996 (02.05.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01389 (22) Date de dépôt international: 20 octobre 1995 (20.10.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/12598 21 octobre 1994 (21.10.94) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 145, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cédex 16 (FR). ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON [FR/FR]; 46, allée d'Italie, F-69007 Lyon 7 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SAMARUT, Jacques [FR/FR]; 169 bis, route de Genas, F-69100 Villeurbanne (FR). PAIN, Bertrand [FR/FR]; 4 bis, place Bir-Hakeim, F-69003 Lyon (FR). (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: ACTIVE RETINOIC ACID FREE CULTURE MEDIUM FOR AVIAN TOTIPOTENTIAL EMBRYONIC CELLS (54) Titre: MILIEU DE CULTURE DE CELLULES EMBRYONNAIRES TOTIPOTENTES AVIAIRES, DEPOURVU D'ACIDE RETINOIQUE ACTIF (57) Abstract <p>A culture medium for avian totipotent embryonic cells comprising an avian cell culture medium is disclosed. The culture medium is characterised in that it comprises elements complementary to said avian cell culture medium, the complementary elements being selected from the group which comprises cytokines, fibroblast growth factors, insulin-like growth factors and stem cell growth factors, and in that it is substantially free of active retinoic acid. A method for culturing avian totipotent embryonic cells, and the resulting products, are also disclosed.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne un milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires du type comportant un milieu de culture pour cellules aviaires, caractérisé en ce qu'il comporte des éléments complémentaires dudit milieu de culture pour cellules aviaires, lesdits éléments complémentaires étant choisis dans le groupe comprenant: les cytokines, les facteurs de croissance des fibroblastes, les facteurs de croissance analogues de l'insuline, les facteurs de croissance des cellules souches, et en ce qu'il est substantiellement dépourvu d'acide rétinolique actif. Elle concerne également un procédé de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires et les produits pouvant être obtenus par ce procédé.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Biélorus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

**MILIEU DE CULTURE DE CELLULES EMBRYONNAIRES TOTIPOTENTES AVIAIRES,
DEPOURVU D'ACIDE RETINOIQUE ACTIF**

5 La présente invention se rapporte à l'obtention de cellules ES d'oiseau, en particulier à un procédé de culture et à un milieu permettant la culture de ces cellules.

 En effet, dans le cadre de la mise au point de technique de production de protéines recombinantes, le développement d'une technique
10 de transgénèse chez les oiseaux domestiques aura des retombées économiques extrêmement importantes dans deux applications majeures:

- 1. le développement de souches aviaires présentant des caractères génétiques déterminés (résistance à certaines maladies, performances de croissance, etc)
- 15 - 2. le développement de systèmes de production de protéines recombinantes dans l'albumen de l'oeuf.

 L'industrie biotechnologique s'intéresse de plus en plus à la possibilité de produire des protéines d'intérêt dans des fluides biologiques ou des organismes (sang, lait, plantes, ...). La production de telles protéines
20 dans l'oeuf d'oiseau domestique constituera certainement dans cette voie une avancée technologique majeure pour plusieurs raisons:

- de nombreuses protéines de mammifères ne peuvent être produites en système mammifère car leur surabondance dans ces organismes présente des effets délétères (exemple: l'érythropoïétine qui
25 chez le lapin induit des hyperglobulinémies pathologiques). Beaucoup de ces protéines d'intérêt ne présentent pas d'activité croisée avec celles des oiseaux, autorisant ainsi leur surproduction dans un organisme aviaire sans effet pathologique majeur;

- il est très vraisemblable que la commercialisation de protéines
30 recombinantes produites chez des mammifères se heurtera à des problèmes sanitaires liés à la présence chez cette espèce d'organismes latents potentiellement pathogènes pour l'Homme (lentivirus, prions,...). Ce risque est très minime, pour ne pas dire quasiment inexistant, pour des agents pathogènes des oiseaux domestiques;

- l'oeuf constitue un "tissu" très dense en un petit nombre de protéines. Par exemple la protéine majeure de l'oeuf d'oiseau, l'ovalbumine représente 54 % des protéines du blanc d'oeuf, soit un poids sec moyen par oeuf de 2 grammes de matière sèche environ. On peut raisonnablement

5 imaginer produire par oeuf au moins 10% de cette masse en protéine recombinante. La rentabilité économique apparaît très grande si l'on considère qu'une poule pond en moyenne 2 oeufs tous les trois jours, et cette rentabilité apparaît très supérieure à celle de grands mammifères si l'on considère les coûts d'élevage bien moindres des oiseaux domestiques.

10 La réalisation d'oiseaux transgéniques est possible actuellement avec un coût extrêmement élevé à cause de sa très faible efficacité. En effet chez les oiseaux la technique de microinjection d'ADN dans l'oeuf est quasiment impossible. D'autre part l'utilisation du système des rétrovirus vecteurs, le seul système efficace à ce jour, reste complexe et se heurtera

15 certainement à une réticence de la part des industriels pour des raisons sanitaires.

Une avancée très importante à la réalisation d'animaux transgéniques a été apportée chez la souris par le développement de la technologie des cellules ES.

20 Les cellules ES (pour Embryonic Stem cells) sont des cellules embryonnaires totipotentes capables de régénérer tous les tissus de l'embryon, y compris le tissu germinale, après leur injection dans des embryons très précoces. Ces cellules peuvent donc être considérées comme des chevaux de Troie pour introduire de nouvelles informations

25 génétiques dans le patrimoine génétique d'un animal. La possibilité de cultiver ces cellules à long terme in vitro, offre la possibilité d'exercer de nombreux contrôles avant leur implantation in vivo. D'autre part ces cellules peuvent être conservées de façon illimitée dans l'azote liquide, ce qui constitue une possibilité de stockage d'un patrimoine génétique.

30 L'utilisation de cellules ES constitue aujourd'hui chez les oiseaux domestiques la voie la plus prometteuse pour la réalisation efficace d'animaux transgéniques.

Des travaux récents d'un groupe canadien (R. Etches à la station de Guelph) ont suggéré que des cellules ES doivent exister dans l'embryon d'oiseau (Petitte et al., 1990). Ce groupe a réussi la transplantation de telles cellules dans des embryons, et par suite, la production d'animaux dont le patrimoine génétique est dérivé des cellules greffées. Cependant à ce jour la culture de ces cellules in vitro n'a pas pu être réussie ; par conséquent ces cellules n'ont pas pu être utilisées pour transférer de façon stable un transgène. C'est là un blocage majeur à l'exploitation de la technologie des cellules ES chez les oiseaux. Les cellules ES peuvent être caractérisées par trois types de critères essentiels :

- morphologie
- activité phosphatase alcaline endogène
- réaction avec des anticorps spécifiques d'un état de totipotence (ECMA-7, SSEA-1 et SSEA-3 notamment).

Aucune culture de cellules ES identifiées par l'ensemble de ces caractéristiques n'a pu être obtenue à ce jour.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires du type comportant un milieu de culture pour cellules aviaires, caractérisé en ce qu'il comporte des éléments complémentaires dudit milieu de culture pour cellules aviaires, lesdits éléments complémentaires étant choisis dans le groupe comprenant : les cytokines, les facteurs de croissance des fibroblastes, les facteurs de croissance analogue de l'insuline, les facteurs de croissance des cellules souches,

et en ce qu'il est substantiellement dépourvu d'acide rétinoïque actif.

De manière avantageuse, l'acide rétinoïque est substantiellement inactivé par des anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA) présents dans le milieu.

En effet, les milieux employés contiennent souvent du sérum, dont on ne peut contrôler la quantité endogène d'acide rétinoïque. En testant l'effet de l'incorporation au milieu de culture d'un anticorps monoclonal anti-acide rétinoïque qui neutraliserait l'action de ce dernier, sur la différenciation des cellules, la Demanderesse a constaté que la présence de cet anticorps accroît la présence dans les cultures de cellules et colonies à activité phosphatase alcaline.

La cytokine peut notamment être choisie parmi le LIF, IL-11, IL-6, CNTF et oncostatine M (OSM) ; de manière avantageuse les cytokines présentes dans le milieu de culture décrit précédemment, comprennent au moins une cytokine choisie dans le groupe constitué de LIF, IL-11, IL-6, et
5 leurs différents mélanges, qui donnent les meilleurs résultats de stimulation de croissance.

De préférence, le facteur de croissance des fibroblastes est le b- FGF (ou basic Fibroblast Growth Factor) et le facteur de croissance analogue de l'insuline est l'IFG-1.

10 Le facteur de croissance des cellules souches (ou SCF) est de préférence l'a-SCF (ou avian Stem Cell Factor) et le m-SCF (ou murine Stem Cell Factor).

L'un des aspects préférés de l'invention concerne un milieu de culture qui contient, outre les éléments nutritifs de base nécessaires à la
15 croissance de cellules, une combinaison de b-FGF, SCF et LIF. En outre, la présence dans le milieu d'un anticorps monoclonal neutralisant l'activité de différenciation exercée par l'acide rétinolique augmente le nombre de cellules souches embryogènes totipotentes.

La présence d'un tapis de cellules nourricières favorise la
20 croissance de cellules ES aviaires. Divers types de cellules connues de l'homme du métier peuvent être utilisées ; on peut citer en particulier des cellules telles que les cellules STO, traitées à la mitomycine ou irradiées, les cellules BRL-3A, les cellules LMII, les cellules QT6 et cellules QT6 modifiées telles que les cellules QT6 Isolde, les cellules différenciées établies en
25 lignée à partir des cultures de cellules souches embryonnaires induites à différencier.

Les cellules STO sont des fibroblastes d'embryons de souris (catalogue ATCC) ; les cellules BRL-3A (catalogue ATCC) sont des cellules de foie de "Buffalo rat liver". Les cellules QT6 (catalogue ATCC) et cellules QT6
30 modifiées telles que les cellules QT6 Isolde sont des fibroblastes de caille (Cosset et col., 1990, J. Virol. 64, 10170-1078) et les cellules LMII proviennent de carcinome de foie de poulet (Kawaguchi et col., 1987, Cancer Res., 47, 4460-4464).

Le milieu de culture contient en outre différents éléments nutritifs
35 essentiels et des antibiotiques.

Un milieu de culture particulièrement adapté à la présente invention possède la composition suivante :

BHK-21

	Sérum foetal de bovin	10%
5	Sérum de poulet	2%
	Conalbumine	20 ng/ml
	Acides aminés non essentiels	1%
	Pyruvate de sodium	1 mM
	Nucléosides stock	1%
10	Hepes (1M)	10 mM
	β -mercaptoéthanol	0,2 mM
	Penicilline	100 U/ml
	Streptomycine	100 μ g/ml
	Gentamycine	10 ng/ml

15

Additifs:

Final

20	bFGF	de 1 à 20 ng/ml
	α -SCF	de 0,5% à 2% vol/vol
	IGF-1	de 5 à 50 ng/ml
	LIF	de 1000 à 5000 U/ml de forme purifiée soit environ de 0,1% à 2% vol/vol de surnageant de culture de cellules COS
25		transfectées
	IL-6	de 5 à 50 ng/ml (environ de 0,1% à 2% vol/vol de surnageant de culture de cellules COS transfectées)
	IL-11	de 5 à 50 ng/ml (environ de 0,1% à 2% vol/vol de surnageant de culture de cellules COS transfectées)

30

De manière avantageuse la concentration en bFGF est supérieure à 5 mg/ml et la concentration en IGF-1 est supérieure à 10 ng/ml.

avec le stock de nucléosides constitué du mélange :

	adénosine	80 mg
	guanosine	85 mg
5	cytidine	73 mg
	uridine	73 mg
	thymidine	24 mg
	H ₂ O	100 ml

et SN de Cos représentant un surnageant de culture de cellules COS-7
10 transfectées en expression transitoire avec un vecteur d'expression du
cDNA du facteur considéré,

et convient à la culture de cellules embryonnaires totipotentes d'oiseau.

Le milieu BHK21 (ou milieu MEM) est un milieu de culture qui a été
décrit notamment par Mc Pherson, I., et Stoker (1962, Virology 16, 147).

15 Hepes est de l'hydroxy-éthyl-pipérazine-éthane-sulfonate.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet un procédé de
culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires (ou cellules ES
aviaires), caractérisé en ce que :

a) on met en suspension des cellules provenant de disques
20 blastodermiques d'oeufs fécondés dans un milieu de culture pour
cellules aviaires comprenant en outre au moins un composé choisi
parmi les cytokines, les facteurs de croissance des fibroblastes, les
facteurs de croissance analogue de l'insuline, les facteurs de croissance
des cellules souches, et dans lequel l'acide rétinolique est
25 substantiellement inactivé,

b) onensemence un tapis de cellules nourricières ou une boîte de culture
gélatinée avec la suspension obtenue à l'issue de l'étape a),

c) on met les cellules à incuber pendant une durée déterminée,

d) les cellules en culture sont prélevées et purifiées afin de récupérer des
30 cellules ES d'oiseau.

De préférence, entre les étapes c) et d) on effectue une ou plusieurs
additions échelonnées dans le temps, de milieu neuf identique à celui
utilisé dans l'étape a).

Dans un de ses modes de mise en oeuvre, au cours de l'étape c), on effectue un réensemencement du milieu par une suspension de cellules identique à la suspension préparée à l'étape a).

Le milieu de l'étape a) contient de préférence les éléments suivants:

- 5 b-FGF, a-SCF, IGF-1, LIF, IL-11, IL-6 et anticorps anti-acide rétinoïque. Selon l'un des aspects de l'invention, il contient en outre les composés suivants :

- . Sérum foetal de bovin
- 10 . Sérum de poulet .
- . Conalbumine
- . Acides aminés non essentiels
- . Pyruvate de sodium
- . Stock de nucléosides
- 15 . Hepes (1M)
- . β -mercaptoéthanol
- . Penicilline
- . Streptomycine
- . Gentamycine

20

avec le stock de nucléosides, constitué du mélange :

adénosine, guanosine, cytidine, uridine et thymidine en solution aqueuse.

- De manière facultative, au cours du procédé selon l'invention, on effectue entre les étapes c) et d) l'addition de milieu neuf au 3ème jour puis le milieu est changé tous les jours jusqu'au prochain repiquage.
- 25

L'étape d) peut notamment être effectuée par traitement enzymatique, lavage dans un milieu ne contenant pas de facteur de croissance et centrifugation.

- On peut recueillir directement les cultures primaires de cellules, qui seront ensuite congelées, ou bien réaliser des cultures secondaires successives à partir des cellules de la culture primaire. Dans ce cas, à l'issue de l'étape d), on effectue une étape e) dans laquelle, les cellules ES sont réensemencées sur un tapis de cellules nourricières ou sur boîtes gélatinées, de manière à obtenir une culture secondaire.
- 30

35

Les étapes d) et e) peuvent être répétées plusieurs fois pour avoir des cultures tertiaires et successives.

Le tapis de cellules nourricières peut être constitué de différents types de cellules décrits précédemment, notamment de cellules STO mitomycinées ou irradiées.

Un autre des objets de l'invention est une culture de cellules ES d'oiseau, ou des cellules ES aviaires, susceptibles d'être obtenues par le procédé défini ci-dessus. Une cellule embryonnaire totipotente aviaire modifiée peut être obtenue par intégration du gène codant pour une protéine hétérologue dans le génome d'une cellule ES-aviaire en culture.

Enfin, un procédé de production d'une protéine recombinante, caractérisé en ce qu'on intègre le gène codant pour ladite protéine dans le génome d'une cellule embryonnaire totipotente aviaire en culture est également compris dans l'invention.

La Demanderesse a mis au point un milieu de culture et des conditions de culture in vitro permettant de maintenir en culture des cellules d'oiseau qui présentent des propriétés morphologiques, cinétiques et histochimiques rappelant celles des cellules embryonnaires totipotentes. Ces observations ont été effectuées aussi bien avec des cellules dérivant de disques blastodermiques de caille que de poulet. La croissance de ces cellules en culture in vitro est rendue possible par la mise au point d'un milieu original spécialement adapté à la culture de cellules embryonnaires d'oiseau. On sait que la présence, le maintien et la propagation de cellules totipotentes en culture permettent leur injection dans des embryons receveurs. La contribution à la morphogenèse des tissus somatiques et germinaux chez les animaux receveurs grâce à un caractère totipotent, peut conduire à l'obtention d'animaux transgéniques.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée. Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

Figure 1: Effet des combinaisons de facteurs

- blastoderme de caille, 0,75 bl/ml
- fond de gélatine
- culture de 3 j

Figure 2: effet de l'anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA)

- blastoderms de caille, 0,75 bl/ml
- fond avec ou sans gélatine
- culture de 4 j

5

Figure 3: comparaison de différentes cytokines

- blastoderms de caille, 2 bl/ml
- fond avec gélatine
- culture de 2 + 3 j

10

Figure 4: Comparaison d'un ensemencement sur gélatine et sur tapis de cellules traitées à la mitomycine C en présence de différentes cytokines appartenant toutes à la même famille.

15

- 4A:**
- blastoderms de caille, 1 + 1,5 bl/ml
 - fond avec gélatine
 - culture de 3 + 4 j

- 4B:**
- blastoderms de caille, 1 + 1,5 bl/ml
 - fond avec cellules STO
 - culture de 3 + 4 j

20

Figure 5: Activité phosphatase alcaline et reconnaissance par ECMA-7

- blastoderms de caille, 1,5 bl/ml
- fond avec cellules STO
- culture de 2 + 3 j

25

Figure 6: Activité phosphatase alcaline et reconnaissance par NC-1

- blastoderms de caille, 1,5 bl/ml
- fond avec cellules STO
- culture de 2 + 3 j

30

Figure 7 : Animaux chimères obtenus par injection in ovo dans des embryons de cellules maintenues en culture. Cellules injectées après 8 ou 10 jours de culture.

35

Matériel et méthodes

Préparation des cellules

Les oeufs de poules fraîchement pondus, non incubés, correspondent au stade X de développement (Eyal Giladi and Kovak, 1976) ; les oeufs de caille " *C. coturnix japonica*" sont également utilisés dès la ponte et non incubés.

Le disque blastodermique (3-4 mm de diamètre pour la poule, 2-2,5 mm pour la caille) est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur dans du milieu complet sans facteurs. Les cellules sont centrifugées à 200 g, lavées deux fois dans du milieu afin d'éliminer le maximum de vitellus contaminant, resuspendues à raison de 2 disques pour 1 ml de milieu et dissociées mécaniquement par passage dans une aiguille de 23 G. Les facteurs sont alors ajoutés.

La suspension cellulaire est déposée:

- soit sur boîtes ou puits (Costar) préalablement gélatinés (0,2 % gélatine, 1 h à t° ambiante),

- soit sur un tapis de cellules STO préalablement traitées à la mitomycine C (90 min, 37°C, 5 µg/ml) et ré-ensemencées à raison de 10⁵ cellules / cm²,

- soit sur un tapis de cellules Isolde préalablement traitées à la mitomycine C (90 min, 37°C, 5 µg/ml) et ré-ensemencées à raison de 10⁵ cellules / cm².

25 Milieu de culture STO :

final

	DMEM	
	Sérum foetal Bovin	10 %
30	Penicilline	100 U/ml
	Streptomycine	100 µg/ml
	L-Glutamine	2 mM

Milieu de culture Isolde :

		final
	DMEM	
5	Sérum foetal Bovin	8 %
	Sérum de poulet	2 %
	Penicilline	100 U/ml
	Streptomycine	100 µg/ml
	G418	100 µg/ml
10	Hygromycine	50 µg/ml
	Phléomycine	50 µg/ml
	TBP (bouillon tryptose phosphate)	10%

15 Les drogues de sélection sont ajoutées en entretien mais enlevées deux jours avant le traitement à la mitomycine C.

Dans tous les cas, un second ensemencement est réalisé dans les mêmes conditions après deux jours de culture.

Cultures

20 Les cultures sont incubées à 37 °C ou à 41° C, dans une atmosphère contrôlée en CO₂ (7,5 %) et leur évolution est suivie au microscope en contraste de phase. Une addition partielle (50 %) de milieu neuf avec les facteurs est réalisée le 3^{ème} jour de culture, puis le milieu est changé tous les jours. A chaque moment, les cellules en croissance peuvent être soit

25 fixées pour étude, soit prélevées pour être ré-ensemencées en culture secondaire ou supérieure, sur tapis de cellules STO mitomycinés irradiés ou sur boîtes gélatinées.

En cas de fixation, les cellules sont lavées en Tris-Glucose deux fois, puis fixées in situ 15 min dans une solution de paraformaldéhyde 4 % à

30 froid (0-4 °C). Après plusieurs lavages au PBS, différentes colorations peuvent être réalisées selon l'un des protocoles suivants :

* détection de l'activité phosphatase alcaline endogène,

5	tampon de réaction:	NaCl	100 mM
		Tris HCl pH 9.5	100 mM
		MgCl ₂	5 mM
		NBT	1 mg/ml
		BCIP	0,1 m/ml
		H ₂ O	

(temps de lecture, de 5 à 30 min, 37°C)

10

** détection de l'activité de β -galactosidase exogène

15	tampon de réaction:	Ferricyanure de K	5 mM
		Ferrocyanure de K	5 mM
		MgCl ₂	5 mM
		X-gal	1 mg/ml
		PBS	

(temps de lecture, de 1 à 2 heures, 37°C)

*** détection par immunocytochimie de la présence d'épitopes spécifiques

20 (réaction à 4°C)

blocage en tampon PBS - BSA (1 mg/ml)

lavage en PBS - BSA

anticorps primaire 1/ 10^{ème} ou 1/ 50^{ème}anticorps secondaire fluorescent 1/ 50^{ème}

25 la détection est réalisée sous microscope inversé à fluorescence.

Repiquage

En cas de passage en culture secondaire ou successive, les cellules sont lavées en Tris-Glucose deux fois, puis incubées 10-30 min dans une solution enzymatique. On peut utiliser une solution de collagénase-dispase (1 mg/ml soit 1 U/ml final) à laquelle une solution de hyaluronidase (1 mg/ml final soit 1 U/ml) peut être ajoutée ; on peut également utiliser une solution de pronase à 0,25 mg/ml final. Les cellules ou les petits amas de cellules ainsi isolés enzymatiquement sont lavées en

- milieu ESA, resuspendus, déposés sur un coussin de milieu de séparation de lymphocyte de densité ($d = 1,077-1,080$) et centrifugés 20 min à t° ambiante à 800 g afin de débarasser les cellules non différenciées de blastoderms des cellules du tapis, des débris divers et des restes de vitellus contaminants.
- 5 L'interface est alors prélevée, lavée deux fois en milieu ESA. Le culot cellulaire obtenu est resuspendu et dissocié légèrement mécaniquement avant d'être ensemencé sur un nouveau tapis de cellules nourricières, comme précédemment décrit. L'équivalent de 6 disques blastodermiques initiaux est ré-ensemencé dans 2 ml. Cette étape de gradient n'est parfois
- 10 pas nécessaire lors des passages successifs, en fonction de la très grande homogénéité des cultures obtenues.

- Les cellules dissociées peuvent être déposées sur un gradient multicouche de Percoll et centrifugées dans les mêmes conditions. Les interfaces sont alors prélevées, lavées dans un milieu ESA et les cellules les
- 15 plus immatures des interfaces supérieures réensemencées, ou injectées dans des embryons receveurs.

Congélation

- A l'issue de la culture primaire ou successive, les cellules
- 20 récupérées de gradient peuvent être congelées dans un mélange constitué de 40 % FBS, 50 % milieu ESA et 10 % DMSO. Les cellules équivalant à 2-4 blastodisques initiaux sont reprises dans 0,5 ml de milieu ESA, resuspendues et 0,4 ml de serum est ajouté. 0,1 ml de DMSO est alors ajouté très lentement. La suspension de congélation est répartie dans des tubes à
- 25 congélation (0,5 ml/tube) et congelée lentement à -80°C avant d'être transférée dans l'azote liquide.

Resultats

- Un milieu de base appelé milieu "ESA" pour "Embryonic Stem cells
- 30 Avian" dérivant d'un milieu utilisé pour les cellules ES murines a été préparé. Il présente la composition suivante :

Milieu "ESA":

		final
5	BHK-21	
	Foetal Bovine Serum	10 %
	Serum de poulet	2 %
	Conalbumine	20 ng/ml
	Acide Aminés non essentiels	1 %
10	Pyruvate de sodium	1 mM
	Stock de nucléosides	1 %
	Hepes (1M)	10 mM
	β -mercaptoethanol	0.2 mM
	Penicilline	100 U/ml
15	Streptomycine	100 μ g/ml
	Gentamycine	10 ng/ml

A ce milieu de base "ESA", des facteurs de croissance ont été ajoutés afin de comparer leur contribution respective à la formation de colonies présentant un caractère morphologique et biochimique intéressant. Leurs concentrations sont indiquées ci-après :

Additifs:

		stock	final
25	bFGF	10 μ g/ml	10 ng/ml
	a-SCF	SN de Cos trans*	1 % vol/vol
	IGF-1	10 μ g/ml	20 ng/ml
	LIF	SN de Cos trans*	1 % vol/vol
	IL-11	10 μ g/ml	10 ng/ml
30	IL-6	10 μ g/ml	10 ng/ml
	ARMA	10 mg/ml	1 μ g/ml
	OSM	20 μ g/ml	20 ng/ml
	CNTF	20 μ g/ml	20 ng/ml

stock de nucléosides

5	adénosine	80 mg
	guanosine	85 mg
	cytidine	73 mg
	uridine	73 mg
	thymidine	24 mg
	H ₂ O	100 ml

* surnageant de culture de cellules COS-7 transfectées en expression transitoire avec un vecteur d'expression du cDNA du facteur considéré.

10

Le premier critère utilisé pour évaluer l'effet de ces facteurs et des modifications apportées au milieu a été la détection par coloration biochimique de l'activité phosphatase alcaline endogène qui semble spécifique d'un certain nombre de cellules telles que les cellules ES totipotentes, les cellules précurseurs dérivées de la lignée germinale et certaines cellules différenciées, facilement identifiables à leur morphologie épithélioïde.

15

Les cellules des disques blastodermiques sont ensemencées en milieu ESA en présence de différentes combinaisons de facteurs. Après 3 j de culture, les cellules sont fixées, colorées et les colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline (AP+) sont dénombrées.

20

L'effet des différentes combinaisons de facteurs est représenté sur la figure 1.

25 Conclusion

Parmi les facteurs testés, la combinaison du SCF (Stem Cell Factor d'origine murine -mSCF- ou aviaire -aSCF-), du b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor) et du LIF (Leukemia Inhibitory Factor) donne le meilleur nombre de colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline dans les cultures avec un accroissement de 2-3 fois par rapport à la présence de chaque facteur ajouté individuellement ou deux par deux et par rapport au fond, constitué en majorité de cellules faiblement positives et présentant une morphologie épithélioïde différenciée.

30

II) Effet de l'anticorps anti-acide rétinoïque (ARMA)

Les cellules sontensemencées soit sur boîtes non traitées, soit
5 traitées à la gélatine dans du milieu ESA complet avec facteurs de
croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic- Fibroblast Growth
Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et LIF (Leukemia Inhibitory
Factor). L'anticorps ARMA est ajouté à raison de 1 µg/ml final. Les cellules
et colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline (AP +) sont
10 dénombrées après 4 j de culture.

Les résultats sont représentés sur la figure 2.

Comparativement aux différents moyens décrits comme l'utilisation
de résine ou de charbon, et testés pour essayer de contrôler le niveau
d'acide rétinoïque dans le milieu, l'addition de l'anticorps anti acide
15 rétinoïque dans le milieu donne les meilleurs résultats quant à la qualité et
la quantité des colonies présentes dans les cultures

Conclusion

L'addition de l'anticorps anti-acide rétinoïque dans le milieu de
20 culture accroît de façon notable la présence et /ou le maintien des colonies
à activité phosphatase alcaline.

III) Effet des cytokines

25 Nous avons voulu vérifier si le LIF ou d'autres cytokines de la même
famille pouvait induire la prolifération des cellules ES chez l'oiseau.

Les cellules sontensemencées en milieu ESA complet avec facteurs
de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic- Fibroblast Growth
Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) en présence d'ARMA (1
30 µg/ml) et après addition ou non de différentes cytokines de la même
famille LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukine 11) et IL-6
(Interleukine 6). Afin d'accroître l'adhésion et la formation de colonies
phosphatase alcaline positives ainsi que leur taille, un second
ensemencement a lieu 2 jours après le premier. La fixation, coloration et
35 lecture des colonies a eu lieu 3 jours après le second ensemencement.

La comparaison de l'effet des différentes cytokines est représentée sur la figure 2.

Conclusion

- 5 Le rôle des cytokines LIF, IL-11 et IL-6 semble particulièrement prononcé et pratiquement équivalent dans l'obtention de colonies positives pour l'activité phosphatase alcaline.

IV) Role d'un tapis de cellules nourricières

10

Chez la souris, la croissance de certaines cellules ES requiert la présence d'un tapis de cellules nourricières. L'effet de ces cellules sur les cellules d'embryons d'oiseau a été testé

- 15 Les cellules sontensemencées dans un milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic-Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et anticorps ARMA (1 µg/ml) comparativement soit sur un fond de gélatine soit sur un tapis de cellules STO traitées à la mitomycine C comme indiqué dans le paragraphe Matériel et Méthodes. Après trois jours de culture, un
20 nouvel ensemencement est ajouté à la culture. Les cytokines CNTF (Ciliary Neuro-Trophic Factor), OSM (Oncostatin M), LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukine 11) et IL-6 (Interleukine 6) sont ajoutées dans le milieu aux concentrations indiquées précédemment.

- 25 La figure 4A représente la croissance de cellules sur gélatine en présence de différentes cytokines. La figure 4B représente la croissance de cellules sur un tapis de cellules nourricières en présence des mêmes cytokines.

Conclusion

- 30 Le nombre de colonies dérivant des cellules de blastoderme et présentant une activité phosphatase alcaline est très nettement accru en présence d'un tapis de cellules nourricières (environ 4-5 fois) avec un

maintien entre les deux systèmes des même sensibilités vis à vis des cytokines ajoutées dans le milieu. Les cytokines LIF, IL-11 et IL-6 présentent les meilleurs résultats de stimulation de croissance. Dans des résultats préliminaires, il apparait de plus que la combinaison de ces 3 cytokines dans le milieu complet ESA avec facteurs produisent des effets cumulatifs très prometteurs quant au maintien et à la prolifération des colonies tant avec des cellules dérivées de disques blastodermiques de caille que de poulet.

10 V) Caractéristiques immunocytochimiques

Des études de réactivité par rapport à différents anticorps ont été réalisées. Les anticorps ECMA-7, SSEA-1 et SSEA-3, spécifiques d'un état de totipotence des cellules ES murines sont capables de reconnaître des épitopes dans les populations de cellules aviaires, maintenues dans les cultures. Pour illustrer ces reconnaissances par les anticorps, des doubles marquages activité phosphatase alcaline et anticorps démontrent que toutes les cellules ou les massifs de cellules reconnues par ECMA-7 présentent une activité phosphatase alcaline. Cette propriété a été observée avec tous les anticorps utilisés à des degrés divers.

Les colonies de cellules phosphatase alcaline positives sont pour environ 20 % d'entre elles marquées par l'anticorps ECMA-7. Cette reconnaissance suggère la présence dans ces massifs et dans ces seules conditions de culture de cellules à caractère "ES". Néanmoins, une hétérogénéité dans les massifs phosphatase alcaline positifs suppose des degrés variables dans l'intensité du caractère "ES".

Cette hétérogénéité de distribution a été observée sur des cultures primaires. Après repiquages, la proportion de cellules positives, notamment pour ECMA-7, mais également pour SSEA-1 et EMA-1, tend à s'accroître de façon très importante pour obtenir des cultures très homogènes.

La figure 5 montre respectivement l'activité phosphatase alcaline et la reconnaissance par l'anticorps ECMA-7 de colonies de cellules issues de la culture de blastodermes de caille en présence de différentes cytokines.

Les anticorps SSEA-1, SSEA-3, également utilisés sur des cellules ES murines reconnaissent également des cellules aviaires dans les massifs phosphatase alcaline positifs.

5 Les anticorps NC-1, HNK-1 dirigés respectivement des épitopes de cellules de crêtes neurales et de cellules "human natural killer" reconnaissent en fait les mêmes épitopes et ont été montrés comme reconnaissant certaines cellules immatures du disque blastodermique de poulet. Dans notre système, ces deux anticorps reconnaissent là encore des cellules dans des massifs à activité phosphatase alcaline.

10 Les résultats avec NC-1 sont représentés sur la figure 6.

Les cellules sontensemencées dans un milieu ESA complet avec facteurs de croissance aSCF (avian Stem Cell Factor), bFGF (basic-Fibroblast Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et anticorps ARMA (1 µg/ml) sur un tapis de cellules STO traitées à la mitomycine C comme indiqué dans le paragraphe Matériel et Méthodes. 15 Après deux jours de culture, un nouvel ensemencement est ajouté à la culture. Les cytokines LIF (Leukemia Inhibitory Factor), IL-11 (Interleukine 11) et IL-6 (Interleukine 6) sont ajoutées dans le milieu aux concentrations indiquées précédemment. La double coloration, activité 20 phosphatase alcaline et détection des épitopes par anticorps est réalisée suivant les protocoles présentés précédemment.

Par ailleurs, l'anticorps EMA-1 (Hahnel and Eddy, 1986) initialement dirigé contre des épitopes présents sur les cellules primordiales de la lignée germinale murine a été utilisé contre ces mêmes cellules chez le 25 poulet. En testant cet anticorps dans notre système de culture, nous pouvons démontrer que EMA-1 reconnaît des cellules et colonies de cellules présentant toutes une activité phosphatase alcaline. Il a été par ailleurs vérifié que cet anticorps EMA-1 ne reconnaissait les cellules ES murines que dans leur état de totipotence non différenciée.

30 Les anticorps ont été testés soit sur des cultures non différenciées obtenues telles que décrites dans Matériel et Méthodes soit sur des cultures qui ont été traitées avec un excès d'acide rétinoïque ajouté à la culture (10^{-6} M) pendant au moins 48 heures. Le tableau ci-après indique l'état de reconnaissance par les différents anticorps utilisés.

5	Anticorps monoclonal	Non différenciées	Différenciées
	ECMA-7	+++++	-
	SSEA-1	+++++	-
	SSEA-3	+++	-
10	TEC-01	+++++	-
	TEC-02	+	+++
	TEC-03	++	++
	EMA-1	++++	+
	EMA-6	+++	+
15	TROMA-1	-	++++
	NC-1	++++	+
	HNK-1	++++	+

NC-1 et HNK-1 reconnaissent les mêmes épitopes

20 SSEA-1 et TEC 01 reconnaissent les mêmes épitopes

Il apparaît que l'expression de ECMA-7 (Kemler et al. (1981)) est la plus importante, suggérant une véritable nature de cellules ES, que TEC-01 (Draber et al. (1987)) et SSEA-1 (Solter and Knowles (1978)) reconnaissent les mêmes épitopes sur des cellules non différenciées exclusivement. A l'inverse, l'augmentation d'expression de TEC-02 (Draber et al. (1987)) peut dans ce sens indiquer un état de différenciation induit ou spontané. L'achèvement de cette perte de nature ES est caractérisée par la forte expression de TROMA-1 (Brulet et al. (1980)), présent sur les seules cellules différenciées. L'ensemble de ces anticorps permet donc d'avoir une idée sur l'état de différenciation d'une culture. Des anticorps comme TEC-03 (Draber et al. (1987)) apparaissent comme relativement indifférents à l'état prononcé de différenciation.

Il est par ailleurs à souligner que jusqu'à présent ni ECMA-7, ni SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, TEC-02, TEC-03, TROMA-1 n'ont fait l'objet de publication démontrant la réactivité sur des coupes, des cellules ou tout matériel d'origine aviaire.

5

Conclusion

Parmi les anticorps testés, certains comme ECMA-7 (Kemler et al. (1981)), SSEA-1 (Solter and Knowles (1978)), SSEA-3 (Shevinsky et al. (1982)) sont caractéristiques des cellules "ES" murines. Ces anticorps reconnaissent des cellules donc potentiellement totipotentes dans les cultures aviaires. Les mêmes observations ayant été obtenues soit avec des cultures de caille soit de poule. D'autres anticorps comme EMA-1 (Hahnel and Eddy (1986)), NC-1 et HNK-1 (Obo and Balch (1981)) sont connus pour reconnaître des épitopes aviaires (et murin pour EMA-1) de cellules très indifférenciées et donc aussi susceptibles de reconnaître un profil de cellules souches aviaires.

15

VI) Repiquage des cellules

Les cellules de disques blastodermiques de caille ou de poulet sont ensemencées sur tapis de cellules nourricières STO. Après différents jours de culture, les cellules sont repiquées sur tapis de cellules STO comme décrit en Matériel et méthodes. La détection de cellules et massifs positifs à la fois pour l'activité de phosphatase alcaline et pour la colocalisation d'un marquage par ECMA-7 ou NC-1 suggère que les conditions de cultures sont définies pour maintenir dans les cultures secondaires et tertiaires des cellules à caractère totipotent. Le processus de repiquage assure d'ailleurs dès après le premier passage une homogénéité à l'ensemble de la culture, tant morphologiquement, que par la détection des différents épitopes. Les massifs de cellules deviennent très étendus et homogènes, caractère accru par la grande capacité de ces cellules à se diviser rapidement, contrairement aux cellules différenciées présentes initialement dans la culture primaire. Jusqu'à présent, ces critères d'identification et de caractérisation peuvent être utilisés et détectés pendant au moins 5 semaines après l'ensemencement.

20

25

30

35

VII) Injection des cellules dans des embryons receveurs

Les cellules blastodermiques de poulet obtenues en cultures primaires ou après repiquages successifs peuvent être injectées dans des embryons receveurs. Afin de visualiser rapidement une contribution phénotypique des cellules du donneur dans un embryon de poussin receveur, les cellules maintenues en culture proviennent d'une souche pigmentée et les embryons receveurs d'une souche non pigmentée. Les cellules maintenues en cultures sont dissociées et préparées comme décrit dans Matériel et Méthodes selon le même procédé que pour un repiquage. La suspension cellulaire est alors préparée à raison de 1 à 3×10^5 cellules par ml de milieu ESA. L'oeuf fraîchement pondu, non incubé contenant l'embryon receveur est légèrement irradié entre 5 Gy et 7 Gy. Une petite fenêtre de quelques mm² est réalisée dans la coquille du receveur par meulage. La membrane coquillière est découpée au scalpel et les cellules sont injectées à l'aide d'un capillaire étiré dans la cavité subgerminale du disque blastodermique dans un volume de 1 à 5 µl, ce qui correspond de 100 à 1500 cellules au maximum. La moyenne des cellules injectées est de 500 cellules. La fenêtre est alors recouverte de membranes coquillières et scellée. Un morceau de pansement adhésif est appliqué pour parfaire l'étanchéité et limiter au maximum l'évaporation. Après 4 jours d'incubation dans les conditions optimales, les oeufs sont ouverts et les embryons bien développés sont transférés dans une coquille plus grande et remis en incubation pour finir leur développement de façon satisfaisante.

Un certain nombre d'animaux ont ainsi été obtenus et montrent un taux apparent de chimérisme, phénotypiquement détectable par le marqueur de plumage utilisé et caractéristique de la souche des cellules dérivant de la souche donneur, variant de 5% à 90%. Ce chimérisme peut être obtenu jusqu'à présent indifféremment avec des cellules dérivant de cultures primaires, secondaires, tertiaires. Il est à noter que les pourcentages d'animaux chimères et les taux de chimérisme de ces animaux ne varient pas de façon importante en fonction du temps de culture des cellules injectées. Ceci contribue à souligner la capacité du milieu et du procédé décrit à maintenir des cellules avec un caractère totipotent.

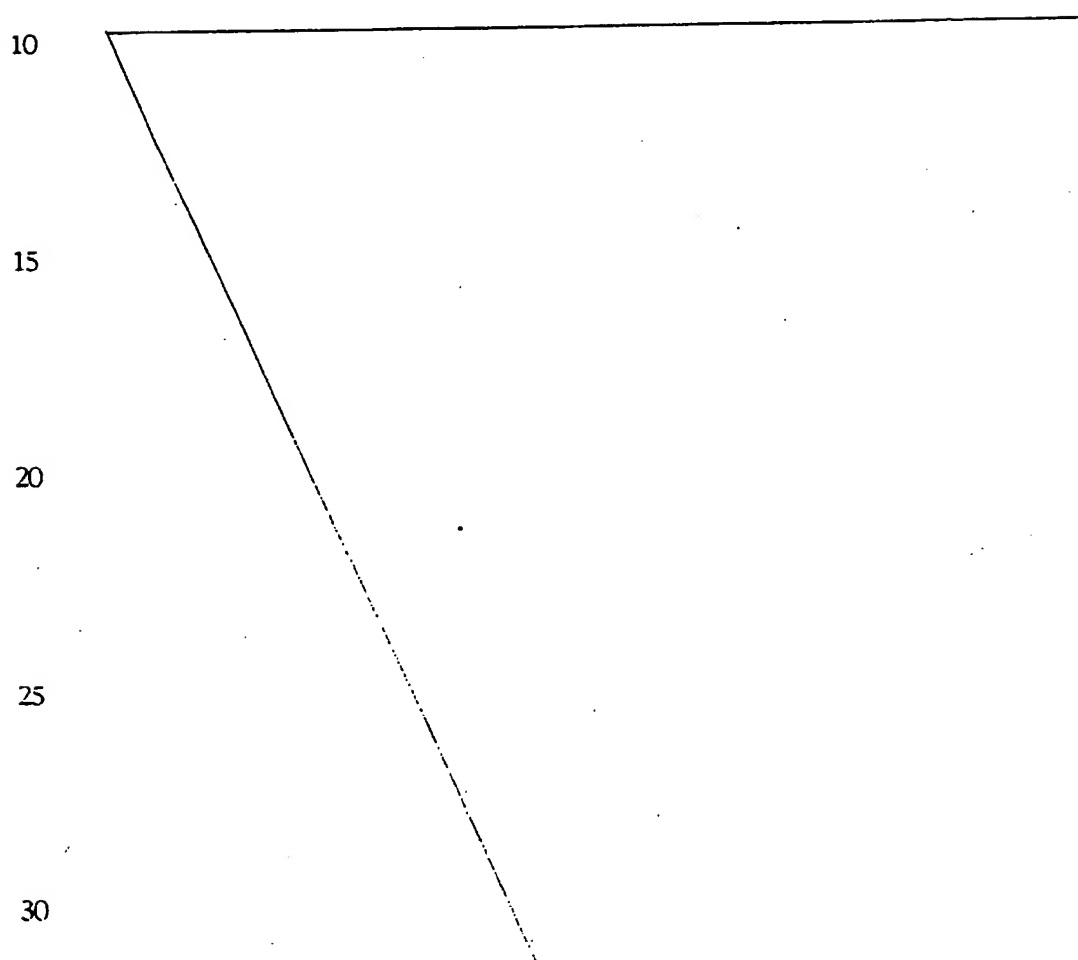
Exemple : animal controle non injecté (Fig. 7A)

Animal n° 1786-1787 à faible taux de chimérisme (5-10%)

Animal n° 1782-1783 à taux moyen de chimérisme (50%)

5 Animal n° 1740-1741 à fort taux de chimérisme (90%)

Ces animaux sont présentés sur les figures 7B à 7D.



REFERENCES

Brulet et al. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 4113.

5 Draber et al. (1987). Cell Differentiation 21, 119.

Draber et al. (1987). Cell differentiation 21, 227.

Hahnel and Eddy (1986). Gamete Research 15, 25.

10

Kemler et al. (1981). J. Embryo. Exp. Morph. 64, 45.

Obo and Balch (1981). J. Immunology 127, 1024.

15 Solter and Knowles (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5565.

Shevinsky et al. (1982). Cell 30, 697.

Tucker et al. (1984). Cell Differentiation 14, 223.

20

Urven et al. (1988). Development 103, 299.

25

30

REVENDICATIONS

1. Milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires
5 du type comportant un milieu de culture pour cellules aviaires, caractérisé en ce qu'il comporte des éléments complémentaires dudit milieu de culture pour cellules aviaires, lesdits éléments complémentaires étant choisis dans le groupe comprenant : les cytokines, les facteurs de croissance des fibroblastes, les facteurs de croissance analogues de l'insuline, les facteurs
10 de croissance des cellules souches, et en ce qu'il est substantiellement dépourvu d'acide rétinolique actif.
2. Milieu de culture selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend des anticorps anti-acide rétinolique (ARMA).
3. Milieu de culture selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce
15 que la cytokine est choisie parmi le LIF, IL-11, IL-6, CNTF, oncostatine M (OSM), et leurs mélanges.
4. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il contient au moins une cytokine choisie dans le groupe constitué de LIF, IL-11, IL-6, et leurs différents mélanges.
- 20 5. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il contient un facteur de croissance des fibroblastes qui est le b-FGF.
6. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il contient un facteur de croissance analogue de l'insuline qui est
25 l'IGF-1.
7. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il contient un facteur de croissance des cellules souches choisi parmi l'a-SCF et le m-SCF.
8. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé
30 en ce qu'il comporte un tapis de cellules nourricières.

9. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il a la composition suivante :

	BHK-21	
5	Sérum foetal de bovin	10%
	Sérum de poulet	2%
	Conalbumine	20 ng/ml
	Acides aminés non essentiels	1%
	Pyruvate de sodium	1 mM
10	Stock de nucléosides	1%
	Hepes (1M)	10 mM
	β -mercaptoéthanol	0,2 mM
	Penicilline	100 U/ml
	Streptomycine	100 μ g/ml
15	Gentamycine	10 ng/ml

Additifs:

Final

20	bFGF	de 1 à 20 ng/ml
	a-SCF	de 0,5% à 2% vol/vol
	IGF-1	de 5 à 50 ng/ml
	LIF	de 1000 à 5000 U/ml de forme purifiée
	IL-6	de 5 à 50 ng/ml
25	IL-11	de 5 à 50 ng/ml

avec le stock de nucléosides constitué du mélange :

	adénosine	80 mg
	guanosine	85 mg
	cytidine	73 mg
5	uridine	73 mg
	thymidine	24 mg
	H ₂ O	100 ml

et SN de Cos représentant un surnageant de culture de cellules COS-7 transfectées en expression transitoire avec un vecteur d'expression du
10 cDNA du facteur considéré.

10. Procédé de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires (ou cellules ES aviaires), caractérisé en ce que :

- a) on met en suspension des cellules provenant de disques blastodermiques d'oeufs non fécondés dans un milieu de culture pour
15 cellules aviaires comprenant en outre au moins un composé choisi parmi les cytokines, les facteurs de croissance des fibroblastes, les facteurs de croissance analogue de l'insuline, les facteurs de croissance des cellules souches, et dans lequel l'acide rétinoïque est substantiellement inactivé,
- 20 b) onensemence un tapis de cellules nourricières avec la suspension obtenue à l'issue de l'étape a),
- c) on met les cellules à incuber pendant une durée déterminée,
- d) les cellules en culture sont prélevées et purifiées afin de récupérer des cellules ES d'oiseau.

25 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'entre les étapes c) et d), on effectue une ou plusieurs additions échelonnées dans le temps, de milieu neuf identique à celui utilisé dans l'étape a).

12. Procédé selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce que le milieu de l'étape a) contient les éléments suivants : b-FGF, a-SCF,
30 IGF-1, LIF, IL-11, IL-6 et des anticorps anti-acide rétinoïque.

13. Procédé selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que le milieu de l'étape a) contient en outre les composés suivants :

- . Sérum foetal bovin
- 5 . Sérum de poulet
- . Conalbumine
- . Acide aminés non essentiels
- . Pyruvate de sodium
- . Stock de nucléosides
- 10 . Hepes (1M)
- . β -mercaptoéthanol
- . Penicilline
- . Streptomycine
- . Gentamycine

15

avec le stock de nucléosides constitué du mélange :
adénosine, guanosine, cytidine, uridine et thymidine en solution aqueuse.

14. Procédé selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisé en ce
20 qu'entre les étapes c) et d), on effectue l'addition de milieu neuf au 3ème
jour, puis tous les jours.

15. Procédé selon l'une des revendications 10 à 14, caractérisé en ce
que l'étape d) est effectuée par traitement enzymatique, lavage dans un
milieu ne contenant pas de facteur de croissance et centrifugation.

25

16. Procédé selon l'une des revendications 10 à 15, caractérisé en ce
qu'à l'issue de l'étape d), on effectue une étape e) dans laquelle, les
cellules ES sont réensemencées sur un tapis de cellules nourricières, de
manière à obtenir une culture secondaire.

17. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que les
30 étapes d) et e) sont répétées plusieurs fois.

18. Procédé selon l'une des revendications 10 à 17, caractérisé en ce que le tapis de cellules nourricières est constitué de cellules STO mitomycinées ou irradiées.

5 19. Culture in vitro de cellules ES aviaires susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une des revendications 10 à 18.

20. Cellule embryonnaire totipotente aviaire modifiée, caractérisée en ce qu'elle peut être obtenue par intégration du gène codant pour une protéine hétérologue dans le génome d'une cellule ES aviaire en culture.

10 21. Animal transgénique obtenu, au moins en partie, à partir de cellule embryonnaire selon la revendication 20.

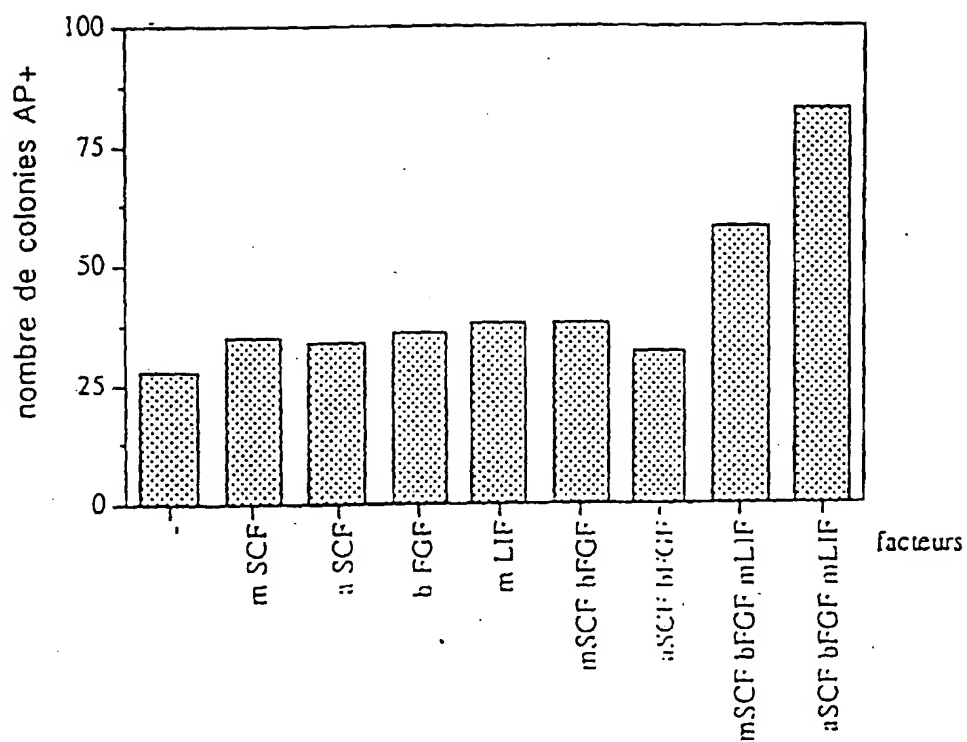


Figure 1

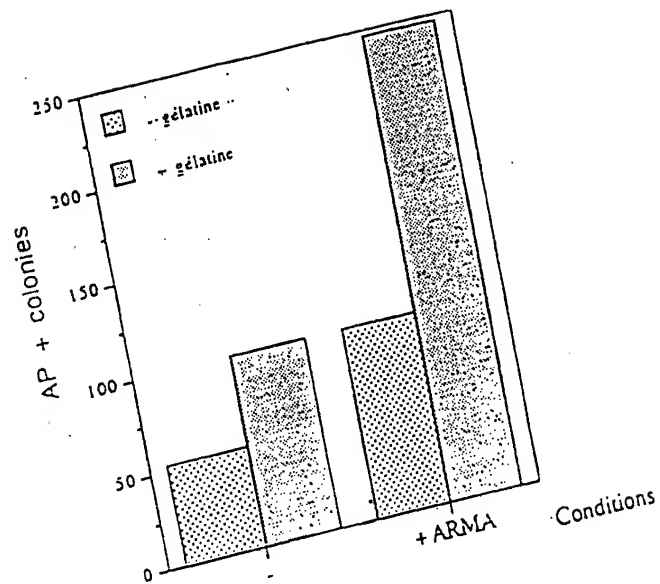


Figure 2

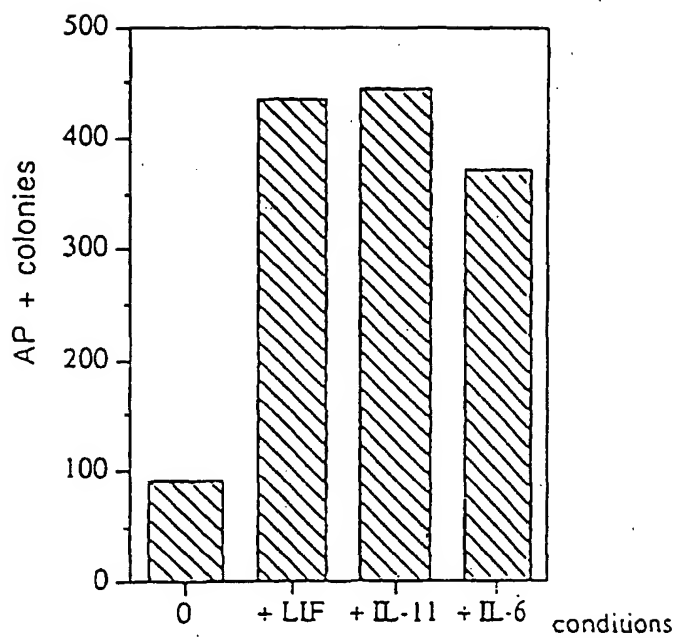
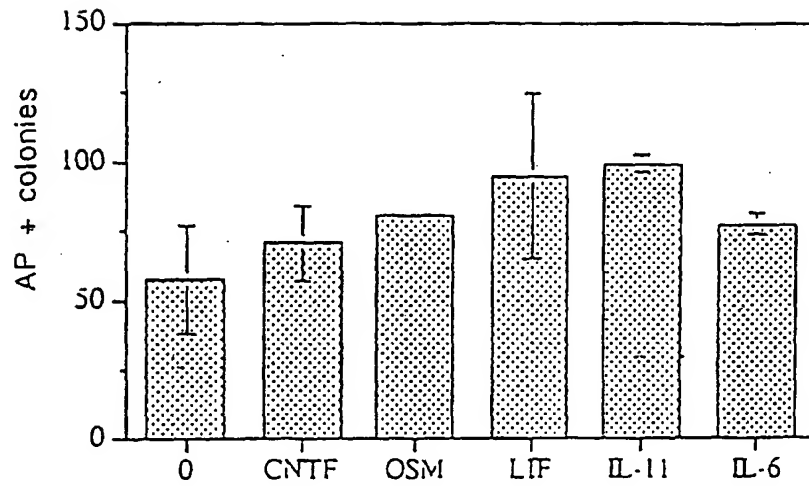
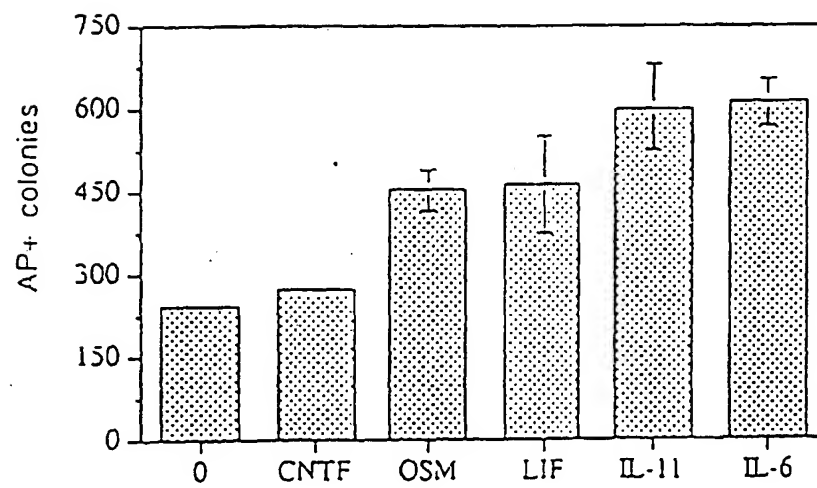


Figure 3



A



B

Figure 4

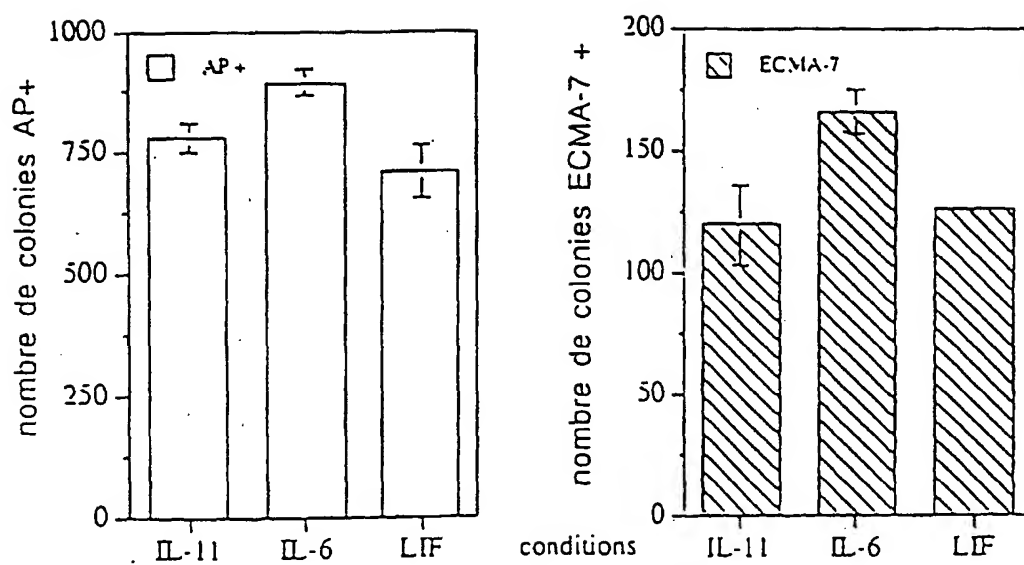


Figure 5

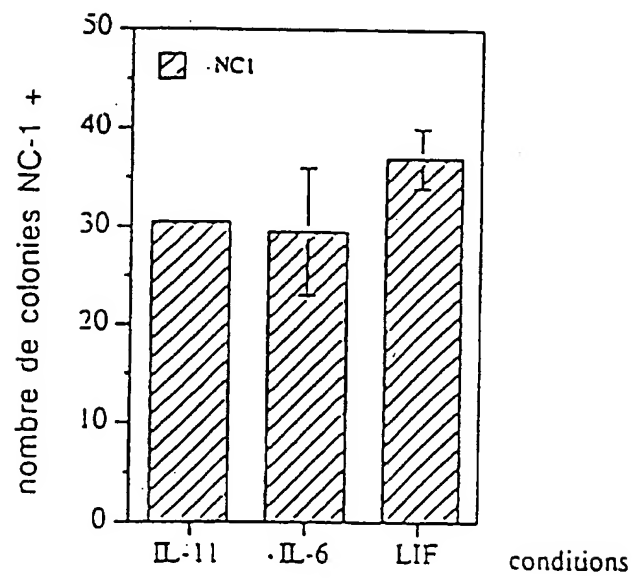


Figure 6



Figure 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01389

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N5/06 C12N5/10 A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO,A,93 15185 (UNIV NORTH CAROLINA ; EMBREX INC (US)) 5 August 1993 see page 3, line 35 - page 4, line 37 ---	19-21
X A	WO,A,93 23528 (UNIV NORTH CAROLINA ; PETITTE JAMES N (US); YANG ZENGMING (US)) 25 November 1993 see page 1, line 6 - page 4, line 18 see page 4, line 32 - page 6, line 27 ---	19-21
X A	WO,A,90 01541 (AMRAD CORP LTD) 22 February 1990 see page 1, line 16 - page 5, line 27 ---	19-21
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 January 1996

Date of mailing of the international search report

05.03.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (- 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (- 31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PLI/FR 95/01389

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABRÉGÉ 87191399, SMITH ET AL 'BUFFALO RAT LIVER CELLS PRODUCE A DIFFUSIBLE ACTIVITY WHICH INHIBITS THE DIFFERENTIATION OF MURINE EMBRYONAL CARCINOMA AND EMBRYONIC STEM CELLS' & DEV BIOL, (1987 MAY) 121 (1) 1-9 see abstract ---	
A	DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABRÉGÉ 93365092, SLAGER ET AL 'TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA IN THE EARLY MOUSE EMBRYO:IMPLICATIONS FOR THE REGULATION OF MUSCLE FORMATION AND IMPLANTATION' & DEV GENET,(1993) 14 (3) 212-24 see abstract ---	
A	R. IAN FRESHNEY 'SECOND EDITION.CULTURE OF ANIMAL CELLS.A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE' 1987 , ALAN R.LISS,INC. , NEW YORK see page 187 - page 196 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/01389

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9315185	05-08-93	AU-B-	3596993	01-09-93
		AU-B-	3597093	01-09-93
		EP-A-	0625007	23-11-94
		JP-T-	7504320	18-05-95
		WO-A-	9314629	05-08-93
		ZA-A-	9300585	01-09-93
		ZA-A-	9300586	01-09-93

WO-A-9323528	25-11-93	US-A-	5340740	23-08-94
		AU-B-	4375193	13-12-93

WO-A-9001541	22-02-90	AU-B-	623922	28-05-92
		AU-B-	4059089	05-03-90
		EP-A-	0380646	08-08-90
		JP-T-	3503241	25-07-91
		US-A-	5166065	24-11-92

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PC1/FR 95/01389

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N5/06 C12N5/10

A01K67/027

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X A	WO,A,93 15185 (UNIV NORTH CAROLINA ; EMBREX INC (US)) 5 Août 1993 voir page 3, ligne 35 - page 4, ligne 37 ---	19-21
X A	WO,A,93 23528 (UNIV NORTH CAROLINA ; PETITTE JAMES N (US); YANG ZENGMING (US)) 25 Novembre 1993 voir page 1, ligne 6 - page 4, ligne 18 voir page 4, ligne 32 - page 6, ligne 27 ---	19-21
X A	WO,A,90 01541 (AMRAD CORP LTD) 22 Février 1990 voir page 1, ligne 16 - page 5, ligne 27 ---	19-21
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 Janvier 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05.03.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dern. Internationale No
PC1/FR 95/01389

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABRÉGÉ 87191399, SMITH ET AL 'BUFFALO RAT LIVER CELLS PRODUCE A DIFFUSIBLE ACTIVITY WHICH INHIBITS THE DIFFERENTIATION OF MURINE EMBRYONAL CARCINOMA AND EMBRYONIC STEM CELLS' & DEV BIOL, (1987 MAY) 121 (1) 1-9 voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>DATABASE MEDLINE FILE SERVER STN KARLSRUHE ABRÉGÉ 93365092, SLAGER ET AL 'TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA IN THE EARLY MOUSE EMBRYO:IMPLICATIONS FOR THE REGULATION OF MUSCLE FORMATION AND IMPLANTATION' & DEV GENET,(1993) 14 (3) 212-24 voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>R.IAN FRESHNEY 'SECOND EDITION.CULTURE OF ANIMAL CELLS.A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE' 1987 , ALAN R.LISS,INC. , NEW YORK voir page 187 - page 196</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dernière Internationale No

PCI/FR 95/01389

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9315185	05-08-93	AU-B-	3596993	01-09-93
		AU-B-	3597093	01-09-93
		EP-A-	0625007	23-11-94
		JP-T-	7504320	18-05-95
		WO-A-	9314629	05-08-93
		ZA-A-	9300585	01-09-93
		ZA-A-	9300586	01-09-93

WO-A-9323528	25-11-93	US-A-	5340740	23-08-94
		AU-B-	4375193	13-12-93

WO-A-9001541	22-02-90	AU-B-	623922	28-05-92
		AU-B-	4059089	05-03-90
		EP-A-	0380646	08-08-90
		JP-T-	3503241	25-07-91
		US-A-	5166065	24-11-92

CABINET REGIMBEAU

26 AVENUE KLEBER - 75116 PARIS / FRANCE

Tél. : 01 45 00 92 02

E-mail : BREVREGI@MICRONET.FR

Télécopie : 01 45 00 46 12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

DEPOSANT

**.INRA-INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE,
.CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE,
.ENS - ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON**

PAYS

USA

TITRE

**Milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes
aviaires, procédé de culture de ces cellules, et cellules
embryonnaires totipotentes aviaires.**

DATE DE DEPOT

12 Mai 1997

No. DE DEPOT

08/817 671

PRIORITE

FRANCE n° 94 12598 du 21 Octobre 1994

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/FR95/01389

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that :

My name and post office address are as stated below ;

That I am knowledgeable in the French language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of my knowledge and belief, the English translation of the international application No. PCT/FR95/01389 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that wilful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such wilful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date : 11 April 1997

P. A. Kendall

Full name of the translator : Philip Arnold KENDALL

For and on behalf of RWS Translations Ltd.

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,
Gerrards Cross, Buckinghamshire,
England.

PCT WORLD ORGANISATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY
International Office
INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT
COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International patent classification ⁶ : C12N 5/06, 5/10, A01K 67/027	A1	(11) International publication number: WO 96/12793 (43) International publication date: 2 May 1996 (02.05.96)
(21) International application number: PCT/FR95/01389 (22) International filing date: 20 October 1995 (20.10.95) (30) Data relating to the priority: 94/12,598 21 October 1994 (21.10.94) FR (71) Applicant (for all designated States except US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/ FR]: 145, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]: 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cédex 16 (FR). ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON [FR/FR]: 46, allée d'Italie, F-69007 Lyon 7 (FR). (72) Inventors: and (75) Inventors/Applicants (US only): Jacques SAMARUT [FR/FR]: 169 bis, route de Genas, F-69100 Villeurbanne (FR). Bertrand PAIN [FR/FR]: 4 bis, place Bir-Hakeim, F-69003 Lyon (FR). (74) Representative: Jacques WARCOIN; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).	(81) Designated States: AU, CA, JP, US, European Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published With the International Search Report. Before expiry of the period provided for amending the claims, will be republished if such amendments are received.	
As printed		
(54) Title: ACTIVE RETINOIC ACID FREE CULTURE MEDIUM FOR AVIAN TOTIPOTENTIAL EMBRYONIC CELLS (54) Titre: MILIEU DE CULTURE DE CELLULES EMBRYONNAIRES TOTIPOTENTES AVIAIRES, DEPOURVU D'ACIDE RETINOIQUE ACTIF (57) Abstract A culture medium for avian totipotent embryonic cells comprising an avian cell culture medium is disclosed. The culture medium is characterised in that it comprises elements complementary to said avian cell culture medium, the complementary elements being selected from the group which comprises cytokines, fibroblast growth factors, insulin-like growth factors and stem cell growth factors, and in that it is substantially free of active retinoic acid. A method for culturing avian totipotent embryonic cells, and the resulting products, are also disclosed. (57) Abrégé La présente invention concerne un milieu de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires du type comportant un milieu de culture pour cellules aviaires, caractérisé en ce qu'il comporte des éléments complémentaires dudit milieu de culture pour cellules aviaires, lesdits éléments complémentaires étant choisis dans le groupe comprenant: les cytokines, les facteurs de croissance des fibroblastes, les facteurs de croissance analogues de l'insuline, les facteurs de croissance des cellules souches, et en ce qu'il est substantiellement dépourvu d'acide rétinolique actif. Elle concerne également un procédé de culture de cellules embryonnaires totipotentes aviaires et les produits pouvant être obtenus par ce procédé.		

ONLY FOR INFORMATION

Codes used to identify the PCT member States on the flyleaves of the brochures in which international applications made under the PCT are published.

AT	Austria	KR	Republic of Korea
AU	Australia	KZ	Kazakhstan
BB	Barbados	LI	Liechtenstein
BE	Belgium	LK	Sri Lanka
BF	Burkina Fasso	LU	Luxembourg
BG	Bulgaria	LV	Latvia
BJ	Benin	MC	Monaco
BR	Brazil	MD	Republic of Moldova
BY	Belarus	MG	Madagascar
CA	Canada	ML	Mali
CF	Central African Republic	MN	Mongolia
CG	Congo	MR	Mauritania
CH	Switzerland	MW	Malawi
CI	Ivory Coast	NE	Niger
CM	Cameroon	NL	Netherlands
CN	China	NO	Norway
CS	Czechoslovakia	NZ	New Zealand
CZ	Czech Republic	PL	Poland
DE	Germany	PT	Portugal
DK	Denmark	RO	Romania
ES	Spain	RU	Russian Federation
FI	Finland	SD	Sudan
FR	France	SE	Sweden
GA	Gabon	SI	Slovenia
GB	United Kingdom	SK	Slovakia
GE	Georgia	SN	Senegal
GN	Guinea	TD	Chad
GR	Greece	TG	Togo
HU	Hungary	TJ	Tajikistan
IE	Ireland	TT	Trinidad and Tobago
IT	Italy	UA	Ukraine
JP	Japan	US	United States of America
KE	Kenya	UZ	Uzbekistan
KG	Kyrghyzstan	VN	Vietnam
KP	Democratic People's Republic of Korea		

ACTIVE RETINOIC ACID-FREE CULTURE MEDIUM
FOR AVIAN TOTIPOTENT EMBRYONIC CELLS

The present invention relates to the obtaining
5 of bird ES cells, especially to a method of culture and
to a medium permitting the culture of these cells.

In effect, in the context of perfecting
recombinant protein production technique, the
development of a technique of transgenesis [sic] in
10 domestic birds will have extremely important economic
repercussions in two major applications:

- 1. the development of avian strains
possessing particular genetic characters (resistance to
certain diseases, growth performance features, and the
15 like)
- 2. the development of recombinant protein
production systems in egg albumin.

The biotechnology industry is showing
increasing interest in the possibility of producing
20 proteins of interest in biological fluids or organisms
(blood, milk, plants, etc.). The production of such
proteins in domestic birds' eggs will certainly
constitute a major technological advance in this
approach, for several reasons:

- 25 - numerous mammalian proteins cannot be
produced in a mammalian system because their
overabundance in these organisms has deleterious
effects (for example erythropoietin, which induces
pathological hyperglobulinemia in rabbits). Many of
30 these proteins of interest do not display cross-
activity with those of birds, thus permitting their
overproduction in an avian organism without major
pathological effect;

- it is very probable that the marketing of
35 recombinant proteins produced in mammals will come up
against health problems associated with the presence in
this [sic] species of latent organisms which are
potentially pathogenic for man (lentiviruses, prions,
etc.). This risk is very minimal, not to say almost

nonexistent, in relation to pathogenic agents of domestic birds;

- the egg constitutes a "tissue" which is very dense with respect to a small number of proteins. For example, the major protein of birds' eggs, ovalbumin, represents 54% of the egg white proteins, equivalent to an average dry weight per egg of 2 grams of dry matter approximately. It is possible reasonably to conceive of producing per egg at least 10% of this mass as recombinant protein. The economic viability is seen to be very great if it is considered that a hen lays on average 2 eggs every three days, and this viability is seen to be much greater than that of large mammals if the much lower breeding costs of domestic birds are considered.

The production of transgenic birds is currently possible at an extremely high cost on account of its very low efficiency. In effect, in birds, the technique of microinjection of DNA into the egg is almost impossible. On the other hand, the use of the vector retrovirus system, the only efficient system to date, remains complex and will certainly come up against a reticence on the part of industrialists on health grounds.

A very great advance in the production of transgenic animals has been brought about in mice by the development of ES cell technology.

ES cells (embryonic stem cells) are totipotent embryonic cells capable of regenerating all the tissues of the embryo, including the germ tissue, after their injection into very early embryos. These cells may hence be considered to be Trojan horses for introducing new genetic information into an animal's genetic constitution. The possibility of culturing these cells in the long term in vitro affords the possibility of exercising numerous controls before their implantation in vivo. Moreover, these cells may be stored without limit in liquid nitrogen, which constitutes a potential for storage of a genetic constitution.

The use of ES cells nowadays constitutes the most promising approach in domestic birds for the efficient production of transgenic animals.

Recent work from a Canadian group (R. Etches at the Guelph station) has suggested that ES cells must exist in the bird embryo (Petitte et al., 1990). This group at [sic] succeeded in transplanting such cells into embryos and consequently producing animals whose genetic constitution is derived from that of the grafted cells. However, to date, it has not been possible for success to be achieved in culturing these cells in vitro; as a result, it has not been possible to use these cells to transfer a transgene in a stable manner. This is a major impediment to the exploitation of ES cell technology in birds. ES cells may be characterized by three essential types of criteria:

- morphology
- endogenous alkaline phosphatase activity
- reaction with antibodies which are specific for a state of totipotency (ECMA-7, SSEA-1 and SSEA-3, in particular).

To date, it has not been possible to obtain any culture of ES cells which are identified by these collective characteristics.

Accordingly, the subject of the present invention is a culture medium for avian totipotent embryonic cells, of the type containing an avian cell culture medium, characterized in that it contains components supplementary to said avian cell culture medium, said supplementary components being chosen from the group comprising: cytokines, fibroblast growth factors, insulin-like growth factors and stem cell growth factors, and in that it is substantially free from active retinoic acid.

Advantageously, the retinoic acid is substantially inactivated by anti-retinoic acid antibodies (ARMA) present in the medium.

In effect, the media employed often contain serum, in which the amount of endogenous retinoic acid cannot be controlled. On testing the effect on cell differentiation of incorporating in the culture medium an anti-retinoic acid monoclonal antibody which would neutralize the action of retinoic acid, the Applicant found that the presence of this antibody increases the presence in the cultures of cells and colonies having alkaline phosphatase activity.

10 The cytokine may be chosen, in particular, from LIF, IL-11, IL-6, CNTF and oncostatin M (OSM); advantageously, the cytokines present in the culture medium described above comprise at least one cytokine chosen from the group consisting of LIF, IL-11, IL-6 and the various mixtures thereof, which give the best results for growth stimulation.

Preferably, the fibroblast growth factor is b-FGF (or basic fibroblast growth factor) and the insulin-like growth factor is IFG-1.

20 The stem cell growth factor (or SCF) is preferably a-SCF (or avian stem cell factor) and m-SCF (or murine stem cell factor).

One of the preferred aspects of the invention relates to a culture medium which contains, besides the basic nutrient components necessary for cell growth, a combination of b-FGF, SCF and LIF. In addition, the presence in the medium of a monoclonal antibody which neutralizes the differentiation activity exerted by retinoic acid increases the number of totipotent embryogenic stem cells.

30 The presence of a lawn of feeder cells promotes the growth of avian ES cells. Various cell types known to a person skilled in the art may be used; there may be mentioned especially cells such as STO cells, treated with mitomycin or irradiated, BRL-3A cells, LMH cells, QT6 cells and modified QT6 cells such as QT6 Isolde cells, differentiated cells established as a line from cultures of embryonic stem cells induced to differentiate.

STO cells are mouse embryo fibroblasts (ATCC catalogue); BRL-3A cells (ATCC catalogue) are liver cells from "Buffalo rat liver". QT6 cells (ATCC catalogue) and modified QT6 cells such as QT6 Isolde
 5 cells are quail fibroblasts (Cosset et al., 1990, J. Virol. 64, 10170-1078) and LMH cells originate from chicken liver carcinoma (Kawaguchi et al., 1987, Cancer Res., 47, 4460-4464).

The culture medium contains, in addition,
 10 various essential nutrient components and antibiotics.

A culture medium which is especially suitable for the present invention possesses the following composition:

BHK-21	
Fetal bovine serum	10%
Chicken serum	2%
Conalbumin	20 ng/ml
Nonessential amino acids	1%
Sodium pyruvate	1 mM
Nucleoside stock	1%
Hepes (1 M)	10 mM
β -Mercaptoethanol	0.2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 μ g/ml
Gentamicin	10 ng/ml

15

Additives:

Final

bFGF	from 1 to 20 ng/ml
α -SCF	from 0.5% to 2% vol/vol
IGF-1	from 5 to 50 ng/ml
LIF	from 1000 to 5000 U/ml of purified form, approximately equivalent to from 0.1% to 2% vol/vol of culture supernatant of transfected COS cells

- IL-6 from 5 to 50 ng/ml (approximately from 0.1% to 2% vol/vol of culture supernatant of transfected COS cells)
- IL-11 from 5 to 50 ng/ml (approximately from 0.1% to 2% vol/vol of culture supernatant of transfected COS cells)

Advantageously, the bFGF concentration is greater than 5 mg/ml and the IGF-1 concentration is greater than 10 ng/ml.

5

with the nucleoside stock consisting of the mixture:

	adenosine	80 mg
	guanosine	85 mg
	cytidine	73 mg
10	uridine	73 mg
	thymidine	24 mg
	H ₂ O	100 ml

and Cos SN representing a culture supernatant of COS-7 cells transfected for transient expression with a vector for the expression of the cDNA of the factor in question,
 15 and is suitable for the culture of bird totipotent embryonic cells.

BHK21 medium (or MEM medium) is a culture medium which has been described, in particular, by McPherson, I., and Stoker (1962, Virology 16, 147).

Hepes is hydroxyethylpiperazineethanesulfonate.

According to another aspect, the subject of the invention is a method of culture of avian totipotent embryonic cells (or avian ES cells), characterized in that:
 25

- a) cells originating from blastoderm disks of fertilized eggs are suspended in an avian cell culture medium comprising, in addition, at least one compound chosen from cytokines, fibroblast growth factors, insulin-like growth factors and stem cell growth factors, and in which the retinoic acid is substantially inactivated,
 30

- b) a lawn of feeder cells or a gelatin-treated culture dish is inoculated with the suspension obtained after step a),
- c) the cells are incubated for a specified period,
- 5 d) the cells in culture are removed and purified so as to recover bird ES cells.

Preferably, between steps c) and d), one or more additions of fresh medium identical to the one
10 used in step a) are performed at intervals of time.

In one of its embodiments, during step c), a reinoculation of the medium with a cell suspension identical to the suspension prepared in step a) is performed.

15 The medium of step a) preferably contains the following components: b-FGF, a-SCF, IGF-1, LIF, IL-11, IL-6 and anti-retinoic acid antibodies. According to one of the aspects of the invention, it contains, in addition, the following compounds:

- 20 . Fetal bovine serum
- . Chicken serum
- . Conalbumin
- . Nonessential amino acids
- 25 . Sodium pyruvate
- . Nucleoside stock
- . Hepes (1 M)
- . β -Mercaptoethanol
- . Penicillin
- 30 . Streptomycin
- . Gentamicin

with the nucleoside stock consisting of the mixture: adenosine, guanosine, cytidine, uridine and thymidine
35 in aqueous solution.

Optionally, during the method of the invention, between steps c) and d), the addition of fresh medium is performed on day 3 and the medium is then changed every day until the next subculturing.

Step d) may be performed, in particular, by enzymatic treatment, washing in a medium not containing any growth factor and centrifugation.

It is possible to collect directly the primary
5 cell cultures, which will then be frozen, or alternatively to produce successive secondary cultures from the cells of the primary culture. In this case, after step d), a step e) is performed in which the ES cells are reinoculated onto a lawn of feeder cells, or
10 onto gelatin-treated dishes, so as to obtain a secondary culture.

Steps d) and e) may be repeated several times in order to have tertiary and successive cultures.

The lawn of feeder cells can consist of various
15 cell types described above, and in particular of mitomycin-treated or irradiated STO cells.

Another of the subjects of the invention is a culture of bird ES cells, or avian ES cells, which are capable of being obtained by the method defined above.
20 A modified avian totipotent embryonic cell can be obtained by integration of the gene coding for a heterologous protein in the genome of an avian ES cell in culture.

Lastly, a method of production of a recombinant
25 protein, characterized in that the gene coding for said protein is integrated in the genome of an avian totipotent embryonic cell in culture, is also included in the invention.

The Applicant has perfected a culture medium
30 and in vitro culture conditions which make it possible to maintain in culture bird cells which possess morphological, kinetic and histochemical properties recalling those of totipotent embryonic cells. These observations have been made with cells derived from
35 both quail and chicken blastoderm disks. The growth of these cells in culture in vitro is made possible by the perfecting of a novel medium especially adapted to the culture of bird embryonic cells. The presence, maintenance and propagation of totipotent cells in

culture are known to permit their injection into recipient embryos. The contribution to the morphogenesis of the somatic and germ tissues in the recipient animals as a result of a totipotent character
 5 may lead to the obtaining of transgenic animals.

The examples which follow are intended to illustrate the invention without in any way limiting its scope. In these examples, reference will be made to the following figures:

10

Figure 1: Effect of the combinations of factors

- quail blastoderms, 0.75 bl/ml
- gelatin base
- 3-d culture

15

Figure 2: Effect of anti-retinoic acid antibody (ARMA)

- quail blastoderms, 0.75 bl/ml
- base with or without gelatin
- 4-d culture

20

Figure 3: Comparison of different cytokines

- quail blastoderms, 2 bl/ml
- base with gelatin
- 2- + 3-d culture

25

Figure 4: Comparison of an inoculation onto gelatin and onto a lawn of mitomycin C-treated cells in the presence of various cytokines all belonging to the same family.

30

- 4A:
- quail blastoderms, 1 + 1.5 bl/ml
 - base with gelatin
 - 3- + 4-d culture

35

- 4B:
- quail blastoderms, 1 + 1.5 bl/ml
 - base with STO cells
 - 3- + 4-d culture

Figure 5: Alkaline phosphatase activity and recognition by ECMA-7

- quail blastoderms, 1.5 bl/ml
- base with STO cells
- 5 - 2- + 3-d culture

Figure 6: Alkaline phosphatase activity and recognition by NC-1

- quail blastoderms, 1.5 bl/ml
- 10 - base with STO cells
- 2- + 3-d culture

Figure 7: Chimeric animals obtained by in ovo injection into embryos of cells maintained in culture. Cells
15 injected after 8 or 10 days of culture.

Materials and methods

Preparation of cells

20 Freshly laid, unincubated hens' eggs correspond to stage X of development (Eyal Giladi and Kovak, 1976); "C. coturnix japonica" quails' eggs are also used from the time of laying and unincubated.

The blastoderm disk (3-4 mm in diameter for the
25 hen, 2-2.5 mm for the quail) is removed using a Pasteur pipette in complete medium without factors. The cells are centrifuged at 200 g, washed twice in medium in order to remove as much contaminating vitellus as possible, resuspended on the basis of 2 disks per ml of
30 medium and dissociated mechanically by passage through a 23 G needle. The factors are then added.

The cell suspension is applied:

- either to dishes or wells (Costar) pretreated with gelatin (0.2% gelatin, 1 h at room t),
- 35 - or to a lawn of STO cells pretreated with mitomycin C (90 min, 37°C, 5 µg/ml) and reinoculated on the basis of 10^5 cells/cm²,

- or to a lawn of Isolde cells pretreated with mitomycin C (90 min, 37°C, 5 µg/ml) and reinoculated on the basis of 10^5 cells/cm².

5 STO culture medium:

		final
	DMEM	
10	Fetal bovine serum	10%
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	L-Glutamine	2 mM

15 Isolde culture medium:

		final
	DMEM	
20	Fetal bovine serum	8%
	Chicken serum	2%
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	G418	100 µg/ml
25	Hygromycin	50 µg/ml
	Phleomycin	50 µg/ml
	TBP (tryptose phosphate broth)	10%

30 The selection drugs are added for maintenance but removed two days before treatment with mitomycin C.

In all cases, a second inoculation is carried out under the same conditions after two days of culture.

35

Cultures

The cultures are incubated at 37°C or at 41°C in a controlled CO₂ (7.5%) atmosphere, and their progress is monitored with a phase contrast microscope.

5 A partial addition (50%) of fresh medium with the factors is carried out on day 3 of culture, and the medium is then changed every day. At each timepoint, the growing cells may be either fixed for study, or removed and reinoculated for secondary or higher
10 culture onto a lawn of irradiated mitomycin-treated STO cells or onto gelatin-treated dishes.

In the case of fixation, the cells are washed twice in Tris-glucose and then fixed in situ for 15 min in 4% paraformaldehyde solution in the cold state
15 (0-4°C). After several washes with PBS, various stains may be applied according to one of the following protocols:

*detection of endogenous alkaline phosphatase activity

20 reaction buffer: NaCl 100 mM
Tris-HCl pH 9.5 100 mM
MgCl₂ 5 mM
NBT 1 mg/ml
BCIP 0.1 m/ml [sic]
25 H₂O

(reading time from 5 to 30 min, 37°C)

**detection of exogenous β-galactosidase activity

30 reaction buffer: K ferricyanide 5 mM
K ferrocyanide 5 mM
MgCl₂ 5 mM
X-gal 1 mg/ml
PBS

35 (reading time from 1 to 2 hours, 37°C)

...immunocytochemical detection of the presence of specific epitopes (reaction at 4°C)

blocking in PBS buffer-BSA (1 mg/ml)

washing in PBS-BSA

5 primary antibody 1/10 or 1/50

fluorescent secondary antibody 1/50

detection is carried out under an inverted fluorescence microscope.

10

Subculturing

In the case of passage to secondary or successive culture, the cells are washed twice in Tris-glucose and then incubated for 10-30 min in an enzyme solution. It is possible to use a solution of collagenase-dispase (1 mg/ml, equivalent to 1 U/ml final) to which a solution of hyaluronidase (1 mg/ml final, equivalent to 1 U/ml) may be added; it is also possible to use a solution of pronase at a final concentration of 0.25 mg/ml. The cells or small clumps of cells thus isolated enzymatically are washed in ESA medium, resuspended, placed on a cushion of lymphocyte separation medium of density ($d = 1.077-1.080$) and centrifuged for 20 min at room t at 800 g in order to rid the undifferentiated blatoderm [sic] cells of the cells of the lawn, miscellaneous debris and contaminating residues of vitellus. The interface is then withdrawn and washed twice in ESA medium. The cell pellet obtained is resuspended and gently dissociated mechanically before being inoculated onto a fresh lawn of feeder cells, as described above. The equivalent of 6 initial blastoderm disks is reinoculated in 2 ml. Sometimes this gradient step is not necessary during successive passages, in accordance with the very great homogeneity of the cultures obtained.

15
20
25
30
35

The dissociated cells may be applied to a multilayer Percoll gradient and centrifuged under the same conditions. The interfaces are then withdrawn and washed in ESA medium, and the most immature cells of the upper interfaces reinoculated or injected into recipient embryos.

Freezing

After primary or successive culture, the cells recovered from the gradient may be frozen in a mixture consisting of 40% FBS, 50% ESA medium and 10% DMSO. Cells equivalent to 24 initial blastodisks are taken up in 0.5 ml of ESA medium and resuspended, and 0.4 ml of serum is added. 0.1 ml of DMSO is then added very slowly. The suspension for freezing is distributed in freezing tubes (0.5 ml/tube) and frozen slowly at -80°C before being transferred to liquid nitrogen.

Results

A basal medium referred to as "ESA", for "embryonic stem cells avian", medium, derived from a medium used for murine ES cells, was prepared. It possesses the following composition:

25 "ESA" medium:

		final
	BHK-21	
	Fetal bovine serum	10%
30	Chicken serum	2%
	Conalbumin	20 ng/ml
	Nonessential amino acid [sic]	1%
	Sodium pyruvate	1 mM
	Nucleoside stock	1%
35	Hepes (1 M)	10 mM
	β -Mercaptoethanol	0.2 mM
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 μ g/ml
	Gentamicin	10 ng/ml

To this "ESA" basal medium, growth factors were added in order to compare their respective contribution to the formation of colonies displaying a morphological and biochemical character of interest. Their concentrations are shown below:

Additives:

		stock	final
10	bFGF	10 µg/ml	10 ng/ml
	a-SCF	trans Cos SN	1% vol/vol
	IGF-1	10 µg/ml	20 ng/ml
	LIF	trans Cos SN	1% vol/vol
	IL-11	10 µg/ml	10 ng/ml
15	IL-6	10 µg/ml	10 ng/ml
	ARMA	10 mg/ml	1 µg/ml
	OSM	20 µg/ml	20 ng/ml
	CNTF	20 µg/ml	20 ng/ml

20 nucleoside stock

	adenosine	80 mg
	guanosine	85 mg
	cytidine	73 mg
25	uridine	73 mg
	thymidine	24 mg
	H ₂ O	100 ml

culture supernatant of COS-7 cells transfected for transient expression with a vector for the expression of the cDNA of the factor in question.

The first criterion used to evaluate the effect of these factors and of the modifications made to the medium was the detection by biochemical staining of the endogenous alkaline phosphatase activity, which seems to be specific for a number of cells such as totipotent ES cells, precursor cells derived from the germ line and certain differentiated cells which can be readily identified with their epithelioid morphology.

Blastoderm disk cells are inoculated in ESA medium in the presence of various combinations of factors. After 3 d of culture, the cells are fixed and stained and the colonies which are positive for alkaline phosphatase activity (AP+) are counted.

The effect of the various combinations of factors is depicted in Figure 1.

Conclusion

Among the factors tested, the combination of SCF (stem cell factor of murine - mSCF - or avian - aSCF - origin), b-FGF (basic fibroblast growth factor) and LIF (leukemia inhibitory factor) gives the best number of colonies which are positive for alkaline phosphatase activity in the cultures, with a 2- to 3-fold increase relative to the presence of each factor added individually or in pairs and relative to the baseline level, consisting predominantly of weakly positive cells displaying a differentiated epithelioid morphology.

II) Effect of anti-retinoic acid antibody (ARMA)

The cells are inoculated onto either untreated or gelatin-treated dishes in complete ESA medium with growth factors aSCF (avian stem cell factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor-1) and LIF (leukemia inhibitory factor). The ARMA antibody is added in the proportion of 1 µg/ml final. The cells and colonies which are positive for alkaline phosphatase activity (AP+) are counted after 4 d of culture.

The results are depicted in Figure 2.

In comparison with the various means described, such as the use of resin or of charcoal, and tested in an effort to control the level of retinoic acid in the medium, the addition of anti-retinoic acid antibody to the medium gives the best results as regards the

quality and amount of the colonies present in the cultures.

Conclusion

5 The addition of anti-retinoic acid antibody to the culture medium significantly increases the presence and/or the maintenance of colonies having alkaline phosphatase activity.

10 III) Effect of cytokines

 We wanted to verify whether LIF or other cytokines of the same family could induce the proliferation of ES cells in birds.

15 The cells are inoculated in complete ESA medium with growth factors aSCF (avian stem cell factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor-1) in the presence of ARMA (1 µg/ml) and after the addition or otherwise of various cytokines of
20 the same family, LIF (leukemia inhibitory factor), IL-11 (interleukin 11) and IL-6 (interleukin 6). In order to increase the adhesion and formation of alkaline phosphatase-positive colonies, as well as their size, a second inoculation takes place 2 days
25 after the first one. The fixation, staining and reading of the colonies took place 3 days after the second inoculation.

 The comparison of the effect of the various cytokines is depicted in Figure 2 [sic].

30

Conclusion

 The role of the cytokines LIF, IL-11 and IL-6 seems especially marked and almost equivalent in the obtaining of colonies which are positive for alkaline
35 phosphatase activity.

IV) Role of a lawn of feeder cells

In mice, the growth of some ES cells requires the presence of a lawn of feeder cells. The effect of these cells on the bird embryo cells was tested.

The cells are inoculated in complete ESA medium with growth factors aSCF (avian stem cell factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor-1) and ARMA antibody (1 μ g/ml), comparatively either onto a gelatin base or onto a lawn of mitomycin C-treated STO cells, as described in the Materials and Methods section. After three days of culture, a further inoculation is added to the culture. The cytokines CNTF (ciliary neurotrophic factor), OSM (oncostatin M), LIF (leukemia inhibitory factor), IL-11 (interleukin 11) and IL-6 (interleukin 6) are added to the medium at the concentrations stated above.

Figure 4A depicts cell growth on gelatin in the presence of various cytokines. Figure 4B depicts cell growth on a lawn of feeder cells in the presence of the same cytokines.

Conclusion

The number of colonies derived from the blastoderm cells and displaying alkaline phosphatase activity is very markedly increased in the presence of a lawn of feeder cells (approximately 4- to 5-fold), with a maintenance between the two systems of the same sensitivities with respect to the cytokines added to the medium. The cytokines LIF, IL-11 and IL-6 [sic] afford the best results for growth stimulation. In preliminary results, it is apparent, furthermore, that the combination of these 3 cytokines in complete ESA medium with factors produce [sic] very promising cumulative effects as regards the maintenance and proliferation of the colonies, with cells derived both from quail and chicken blastoderm disks.

V) Immunocytochemical characteristics

Studies of reactivity with respect to various antibodies were carried out. The antibodies ECMA-7, SSEA-1 and SSEA-3, which are specific for a state of totipotency of murine ES cells, are capable of recognizing epitopes in the avian cell populations maintained in the cultures. To illustrate these recognitions by the antibodies, alkaline phosphatase activity and antibody double labelings demonstrate that all the cells or clumps of cells recognized by ECMA-7 display alkaline phosphatase activity. This property was observed with all the antibodies used, in varying degrees.

Approximately 20% of the colonies of alkaline phosphatase-positive cells are labeled with the antibody ECMA-7. This recognition suggests the presence in these clumps and under these culture conditions alone of cells having "ES" character. Nevertheless, a heterogeneity in the alkaline phosphatase-positive clumps implies variable degrees in the intensity of the "ES" character.

This distribution heterogeneity was observed on primary cultures. After subculturing, the proportion of positive cells, in particular for ECMA-7 but also for SSEA-1 and EMA-1, tends to increase very considerably to obtain very homogeneous cultures.

Figure 5 shows, respectively, the alkaline phosphatase activity and the recognition by the antibody ECMA-7 of colonies of cells originating from the culture of quail blastoderms in the presence of various cytokines.

The antibodies SSEA-1 and SSEA-3, also used on murine ES cells, also recognize avian cells in the alkaline phosphatase-positive clumps.

The antibodies NC-1 and HNK-1, directed, respectively, from [sic] the epitopes of neural crest cells and of human natural killer cells, recognize, in fact, the same epitopes, and have been shown to

recognize certain immature cells of the chicken blastoderm disk. In our system, these two antibodies recognize, here too, cells in clumps having alkaline phosphatase activity.

5 The results with NC-1 are depicted in Figure 6.

 The cells are inoculated in complete ESA medium with growth factors aSCF (avian stem cell factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor-1) and ARMA antibody (1 µg/ml) on a lawn
10 of mitomycin C-treated STO cells as described in the Materials and Methods section. After two days of culture, a further inoculation is added to the culture. The cytokines LIF (leukemia inhibitory factor), IL-11 (interleukin 11) and IL-6 (interleukin 6) are added to
15 the medium at the concentrations stated above. Double staining, alkaline phosphatase activity and detection of the epitopes by antibodies, is carried out according to the protocols presented above.

 Moreover, the antibody EMA-1 (Hahnel and Eddy,
20 1986), initially directed against epitopes present on the primordial cells of the murine germ line, was used against these same cells in chickens. By testing this antibody in our culture system, we can demonstrate that EMA-1 recognizes cells and cell colonies all displaying
25 alkaline phosphatase activity. It was, moreover, verified that this antibody EMA-1 recognizes murine ES cells only in their state of undifferentiated totipotency.

 The antibodies were tested either on
30 undifferentiated cultures obtained as described in Materials and Methods, or on cultures which were treated with an excess of retinoic acid added to the culture (10^{-6} M) for at least 48 hours. The table below indicates the state of recognition by the various
35 antibodies used.

Monoclonal antibody	Undifferentiated	Differentiated
ECMA-7	+++++	-
SSEA-1	+++++	-
SSEA-3	+++	-
TEC-01	+++++	-
TEC-02	+	+++
TEC-03	++	++
EMA-1	++++	+
EMA-6	+++	+
TROMA-1	-	++++
NC-1	++++	+
HNK-1	++++	+

NC-1 and HNK-1 recognize the same epitopes

SSEA-1 and TEC 01 recognize the same epitopes

5

It is apparent that the expression of ECMA-7 (Kemler et al. (1981)) is the largest, suggesting a genuine ES cell nature, and that TEC-01 (Draber et al. (1987)) and SSEA-1 (Solter and Knowles (1978)) recognize the same epitopes on undifferentiated cells exclusively. Conversely, the increase in expression of TEC-02 (Draber et al. (1987)) may, along such lines, indicate an induced or spontaneous state of differentiation. The completion of this loss of ES nature is characterized by the strong expression of TROMA-1 (Brulet et al. (1980)), present only on the differentiated cells. Hence this set of antibodies enables a picture to be built up regarding the state of differentiation of a culture. Antibodies such as TEC-03 (Draber et al. (1987)) are seen to be relatively indifferent to the marked state of differentiation.

20

It should, moreover, be stressed that, hitherto, neither ECMA-7 nor SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, TEC-02, TEC-03 or TROMA-1 have been the subject of a publication demonstrating the reactivity on sections,
5 cells or any material of avian origin.

Conclusion

Among the antibodies tested, some, such as ECMA-7 (Kemler et al. (1981)), SSEA-1 (Solter and
10 Knowles (1978)), SSEA-3 (Shevinsky et al. (1982)), are characteristic of murine "ES" cells. These antibodies recognize cells which are hence potentially totipotent in avian cultures. The same observations having been obtained with either quail or hen cultures. [sic] Other
15 antibodies, such as EMA-1 (Hahnel and Eddy (1986)), NC-1 and HNK-1 (Obo and Balch (1981)), are known to recognize avian epitopes (and murine in the case of EMA-1) of highly undifferentiated cells, and are hence also capable of recognizing a profile of avian stem
20 cells.

VI) Subculturing of the cells

Quail or chicken blastoderm disk cells are
25 inoculated onto a lawn of STO feeder cells. After various days of culture, the cells are subcultured on a lawn of STO cells as described in Materials and Methods. The detection of cells and clumps which are positive both for alkaline phosphatase activity and for
30 the colocalization of a labeling by ECMA-7 or NC-1 suggests that the culture conditions are defined for maintaining cells having totipotent character in the secondary and tertiary cultures. The process of subculturing brings about, moreover, once the first
35 passage has been completed, a homogeneity in the whole of the culture, both morphologically and by the detection of the various epitopes. The clumps of cells become widely spread and homogeneous, a character enhanced by the large capacity of these cells to divide

rapidly, in contrast to the differentiated cells present initially in the primary culture. To date, these identification and characterization criteria may be used and detected for at least 5 weeks after inoculation.

VII) Injection of the cells into recipient embryos

The chicken blastoderm cells obtained in primary cultures or after successive subculturings may be injected into recipient embryos. In order to visualize rapidly a phenotypic contribution of the donor's cells in a recipient chick embryo, the cells maintained in culture originate from a pigmented strain and the recipient embryos from a nonpigmented strain. The cells maintained in cultures are dissociated and prepared as described in Materials and Methods, according to the same method as for a subculturing. The cell suspension is then prepared in the proportion of 1 to 3×10^5 cells per ml of ESA medium. The freshly laid, unincubated egg containing the recipient embryo is lightly irradiated with between 5 Gy and 7 Gy. A small window of a few mm^2 is made in the recipient's shell by grinding. The shell membrane is cut open with a scalpel and the cells are injected using a drawn-out capillary into the subgerminal cavity of the blastoderm disk in a volume of 1 to 5 μl , which corresponds to 100 to 1,500 cells at most. The average number of cells injected is 500 cells. The window is then covered with shell membranes and sealed. A piece of adhesive dressing is applied in order to complete the sealing and limit evaporation as far as possible. After 4 days of incubation under optimal conditions, the eggs are opened and the well-developed embryos are transferred to a larger shell and returned to incubation in order to finish their development in a satisfactory manner.

A number of animals were obtained in this way and show an apparent degree of chimerism, phenotypically detectable by the plumage marker used and characteristic of the strain of cells derived from the donor strain, varying from 5% to 90%. This chimerism can, until now, be obtained equally well with cells derived from primary, secondary or tertiary cultures. It should be noted that the percentages of chimeric animals and the degrees of chimerism of these animals do not vary substantially according to the time of culture of the injected cells. This further emphasizes the capacity of the medium and of the method described to maintain cells with a totipotent character.

15

Example: uninjected control animal (Fig. 7A)

Animal No. 1786-1787 showing a low degree of chimerism (5-10%)

20 Animal No. 1782-1783 showing a moderate degree of chimerism (50%)

Animal No. 1740-1741 showing a high degree of chimerism (90%)

25 These animals are presented in Figures 7B to 7D.

REFERENCES

- Brulet et al. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 4113.
- 5 Draber et al. (1987). Cell Differentiation 21, 119.
- Draber et al. (1987). Cell Differentiation 21, 227.
- Hahnel and Eddy (1986). Gamete Research 15, 25.
- 10 Kemler et al. (1981). J. Embryo. Exp. Morph. 64, 45.
- Obo and Balch (1981). J. Immunology 127, 1024.
- 15 Solter and Knowles (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5565.
- Shevinsky et al. (1982). Cell 30, 697.
- 20 Tucker et al. (1984). Cell Differentiation 14, 223.
- Urven et al. (1988). Development 103, 299.

CLAIMS

1. Culture medium for avian totipotent embryonic
5 cells, of the type containing an avian cell culture
medium, characterized in that it contains components
supplementary to said avian cell culture medium, said
supplementary components being chosen from the group
10 comprising: cytokines, fibroblast growth factors,
insulin-like growth factors and stem cell growth
factors,
and in that it is substantially free from active
retinoic acid.
2. Culture medium according to claim 1,
15 characterized in that it comprises anti-retinoic acid
antibodies (ARMA).
3. Culture medium according to claim 1 or 2,
characterized in that the cytokine is chosen from LIF,
IL-11, IL-6, CNTF, oncostatin M (OSM) and mixtures
20 thereof.
4. Culture medium according to one of claims 1 to
3, characterized in that it contains at least one
cytokine chosen from the group consisting of LIF, IL-
11, IL-6, and the various mixtures thereof.
- 25 5. Culture medium according to one of claims 1 to
4, characterized in that it contains a fibroblast
growth factor which is b-FGF.
6. Culture medium according to one of claims 1 to
5, characterized in that it contains an insulin-like
30 growth factor which is IGF-1.
7. Culture medium according to one of claims 1 to
6, characterized in that it contains a stem cell growth
factor chosen from a-SCF and m-SCF.
8. Culture medium according to one of claims 1 to
35 7, characterized in that it contains a lawn of feeder
cells.
9. Culture medium according to one of claims 1 to
8, characterized in that it has the following
composition:

BHK-21	
Fetal bovine serum	10%
Chicken serum	2%
Conalbumin	20 ng/ml
Nonessential amino acids	1%
Sodium pyruvate	1 mM
Nucleoside stock	1%
Hepes (1 M)	10 mM
β -Mercaptoethanol	0.2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 μ g/ml
Gentamicin	10 ng/ml

Additives:

Final

bFGF	from 1 to 20 ng/ml
a-SCF	from 0.5% to 2% vol/vol
IGF-1	from 5 to 50 ng/ml
LIF	from 1000 to 5000 U/ml of purified form
IL-6	from 5 to 50 ng/ml
IL-11	from 5 to 50 ng/ml

5	with the nucleoside stock consisting of the mixture:
	adenosine .80 mg
	guanosine 85 mg
	cytidine 73 mg
	uridine 73 mg
10	thymidine 24 mg
	H ₂ O 100 ml

and Cos SN representing a culture supernatant of COS-7 cells transfected for transient expression with a vector for the expression of the cDNA of the factor in question.

10. Method of culture of avian totipotent embryonic cells (or avian ES cells), characterized in that:

- a) cells originating from blastoderm disks of unfertilized [sic] eggs are suspended in an avian cell culture medium comprising, in addition, at least one compound chosen from cytokines, fibroblast growth factors, insulin-like growth factors and stem cell growth factors, and in which the retinoic acid is substantially inactivated,
- b) a lawn of feeder cells is inoculated with the suspension obtained after step a),
- c) the cells are incubated for a specified period,
- d) the cells in culture are removed and purified so as to recover bird ES cells.

11. Method according to claim 10, characterized in that, between steps c) and d), one or more additions of fresh medium identical to the one used in step a) are performed at intervals of time.

12. Method according to either of claims 10 or [sic] 11, characterized in that the medium of step a) contains the following components: b-FGF, a-SCF, IGF-1, LIF, IL-11, IL-6 and anti-retinoic acid antibodies.

13. Method according to one of claims 10 to 12, characterized in that the medium of step a) contains, in addition, the following compounds:

- . Fetal bovine serum
- . Chicken serum
- . Conalbumin
- . Nonessential amino acids
- . Sodium pyruvate
- . Nucleoside stock
- . Hepes (1 M)
- . β -Mercaptoethanol
- . Penicillin
- . Streptomycin
- . Gentamicin

with the nucleoside stock consisting of the mixture: adenosine, guanosine, cytidine, uridine and thymidine in aqueous solution.

14. Method according to one of claims 11 to 13, characterized in that, between steps c) and d), the addition of fresh medium is performed on day 3 and then every day.

5 15. Method according to one of claims 10 to 14, characterized in that step d) is performed by enzymatic treatment, washing in a medium not containing any growth factor and centrifugation.

10 16. Method according to one of claims 10 to 15, characterized in that, after step d), a step e) is performed in which the ES cells are reinoculated onto a lawn of feeder cells so as to obtain a secondary culture.

15 17. Method according to claim 15, characterized in that the steps d) and e) are repeated several times.

18. Method according to one of claims 10 to 17, characterized in that the lawn of feeder cells consists of mitomycin-treated or irradiated STO cells.

20 19. In vitro culture of avian ES cells which is capable of being obtained by the method according to one of claims 10 to 18.

20. Modified avian totipotent embryonic cell, characterized in that it can be obtained by integration of the gene coding for a heterologous protein in the genome of an avian ES cell in culture.

25 21. Transgenic animal obtained at least partially from [lacuna] embryonic cell according to claim 20.

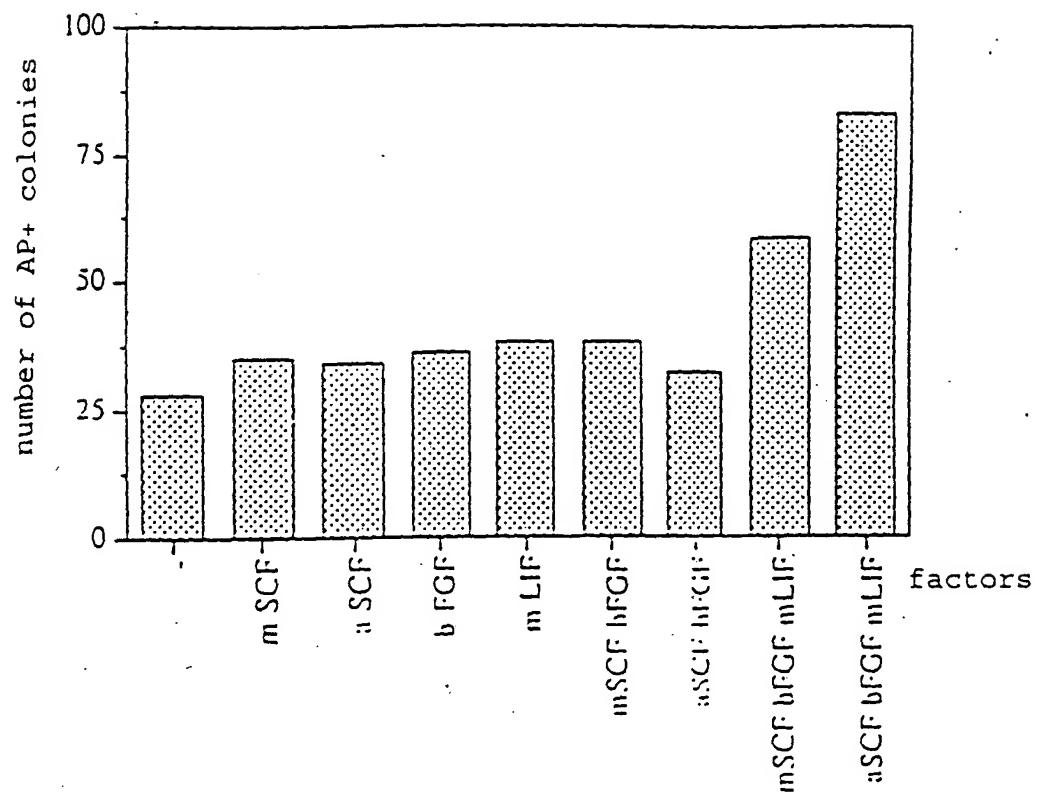


Figure 1

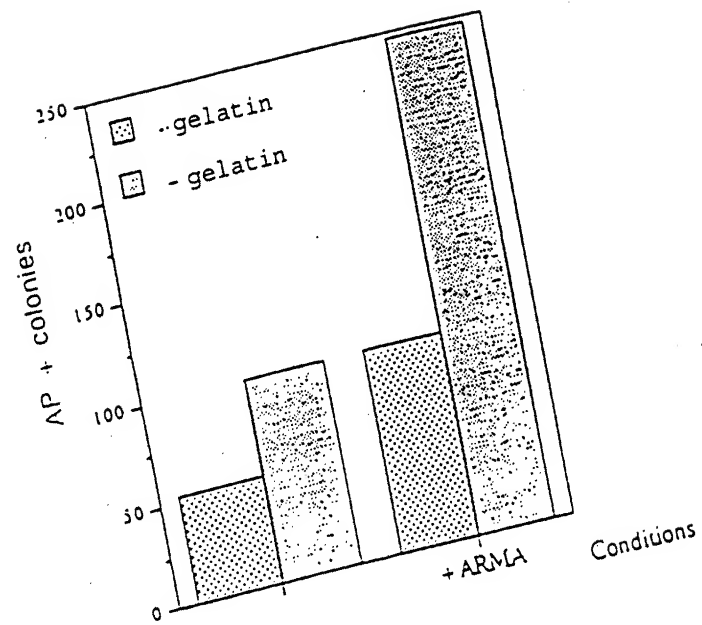


Figure 2

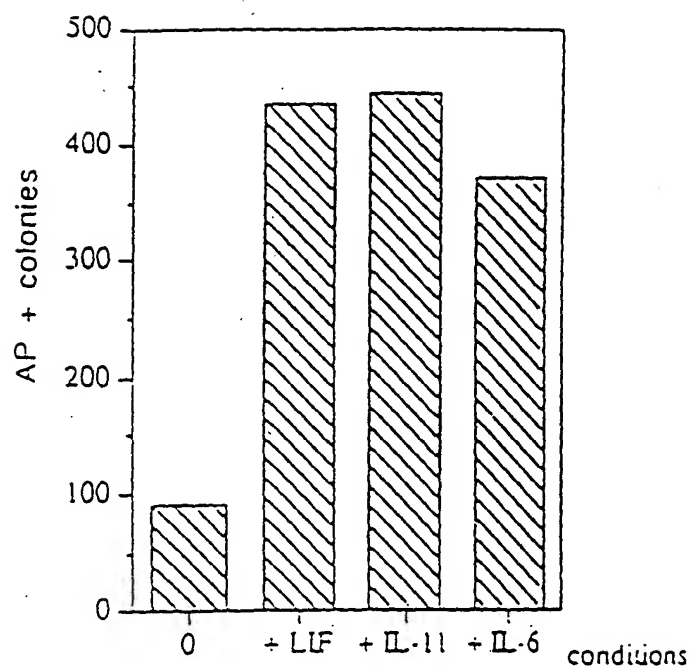
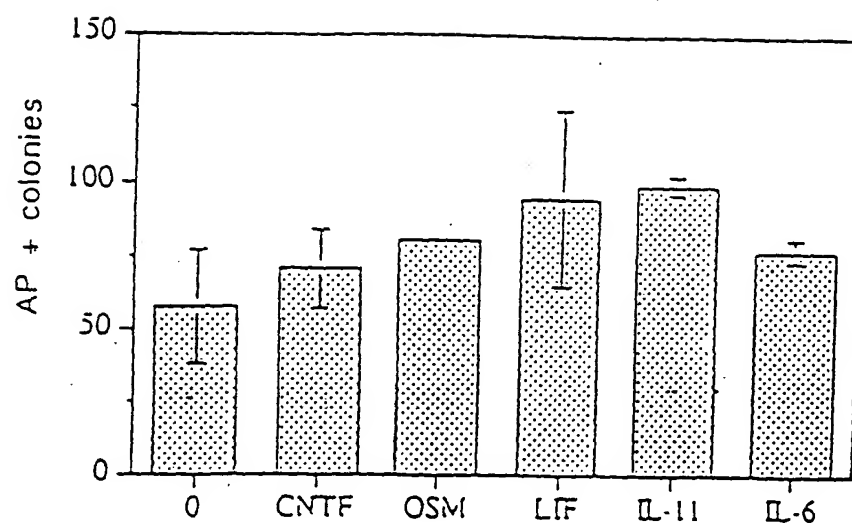
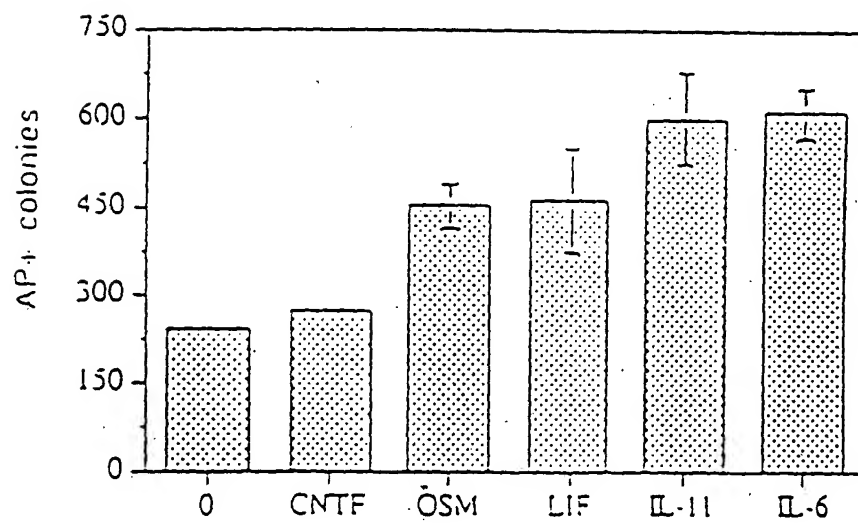


Figure 3



A



B

Figure 4

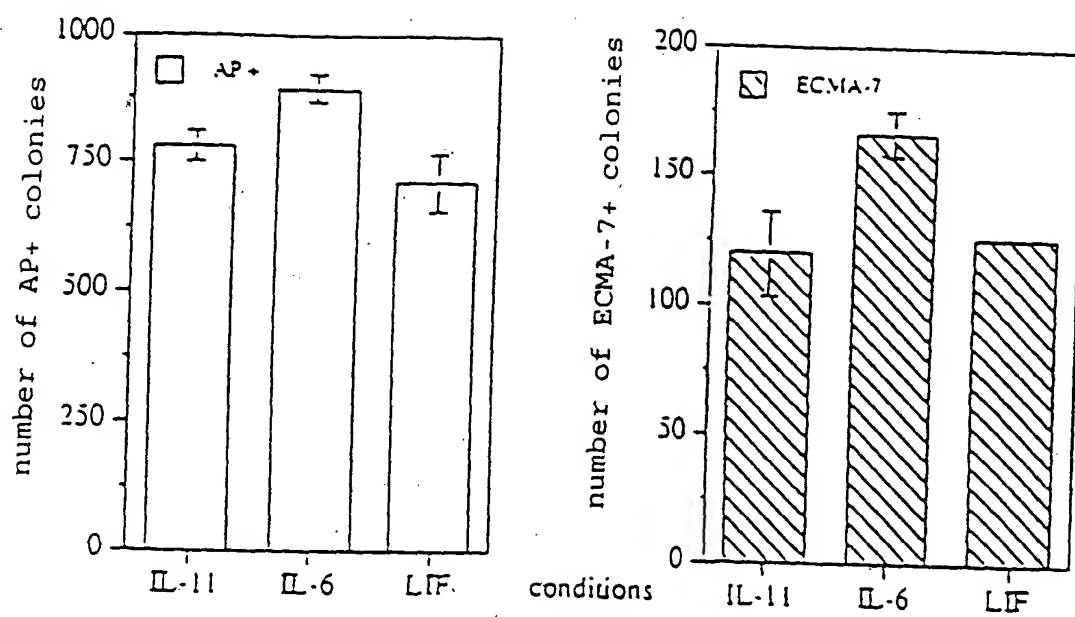


Figure 5

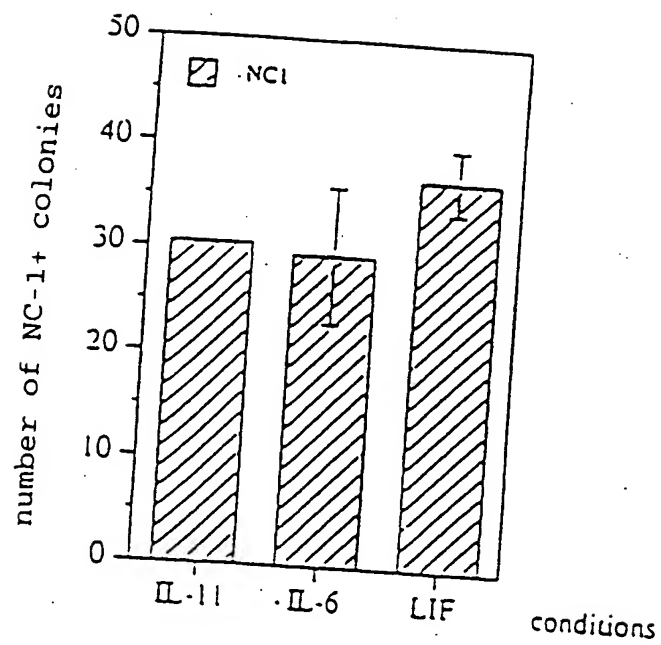


Figure 6

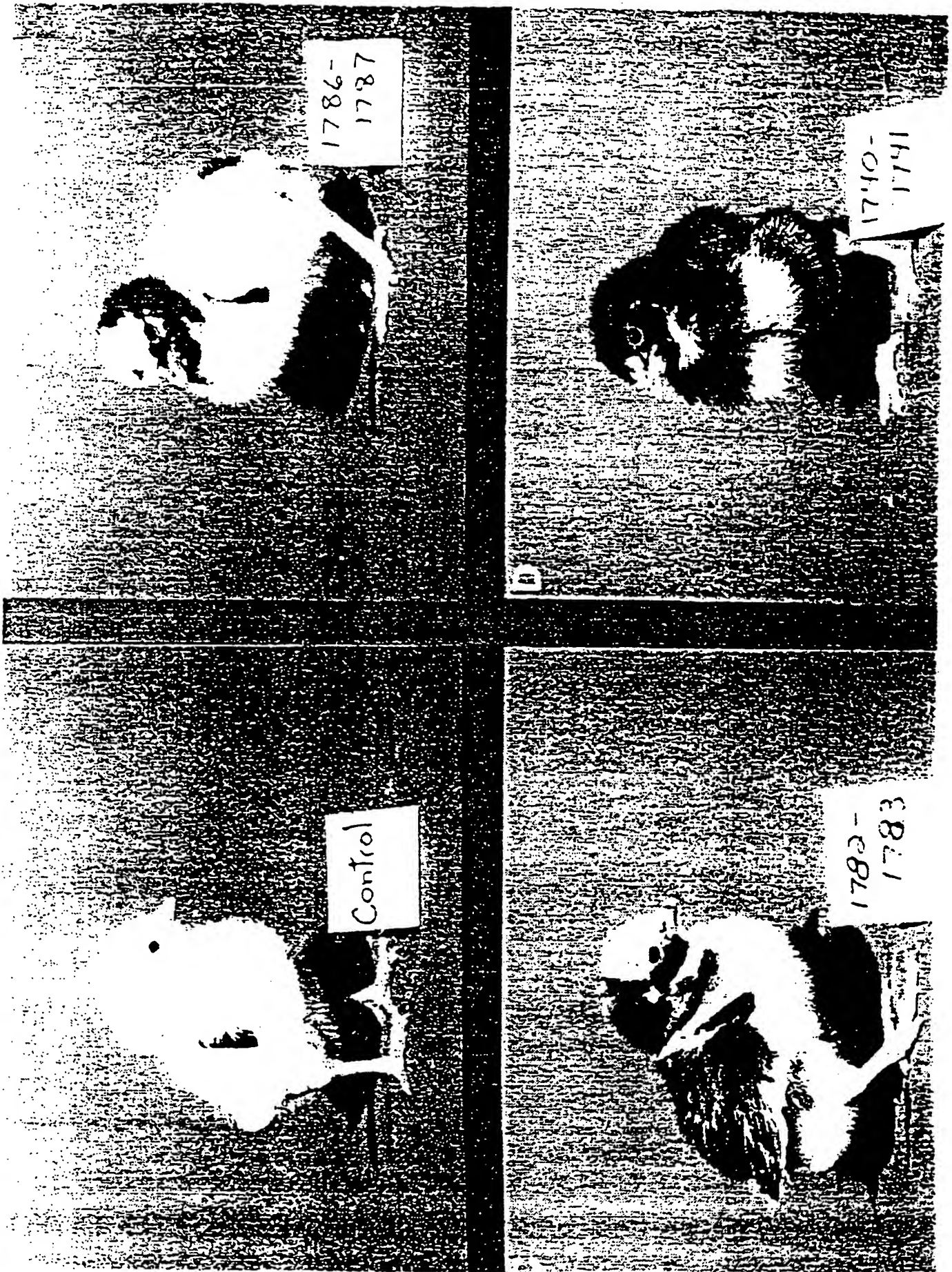


Figure 7

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/FR95/01389

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that :
My name and post office address are as stated below ;
That I am knowledgeable in the French language in which the
below identified international application was filed, and that,
to the best of my knowledge and belief, the English translation
of the replacement sheets of the international application No.
PCT/FR95/01389 is a true and complete translation of the
replacement sheets of the above identified international
application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own
knowledge are true and that all statements made on information
and belief are believed to be true; and further that these
statements were made with the knowledge that wilful false
statements and the like so made are punishable by fine or
imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the
United States Code and that such wilful false statements may
jeopardize the validity of the patent application issued
thereon.

Date : 11 April 1997

P. A. Kendall

Full name of the translator : Philip Arnold KENDALL

For and on behalf of RWS Translations Ltd.

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,
Gerrards Cross, Buckinghamshire,
England.

5

10

A culture medium which is especially suitable for the present invention possesses the following composition:

BHK-21	
Fetal bovine serum	10%
Chicken serum	2%
Conalbumin	20 ng/ml
Nonessential amino acids	1%
Sodium pyruvate	1 mM
Nucleoside stock	1%
Hepes (1 M)	10 mM
β -Mercaptoethanol	0.2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 μ g/ml
Gentamicin	10 ng/ml

15

Additives:

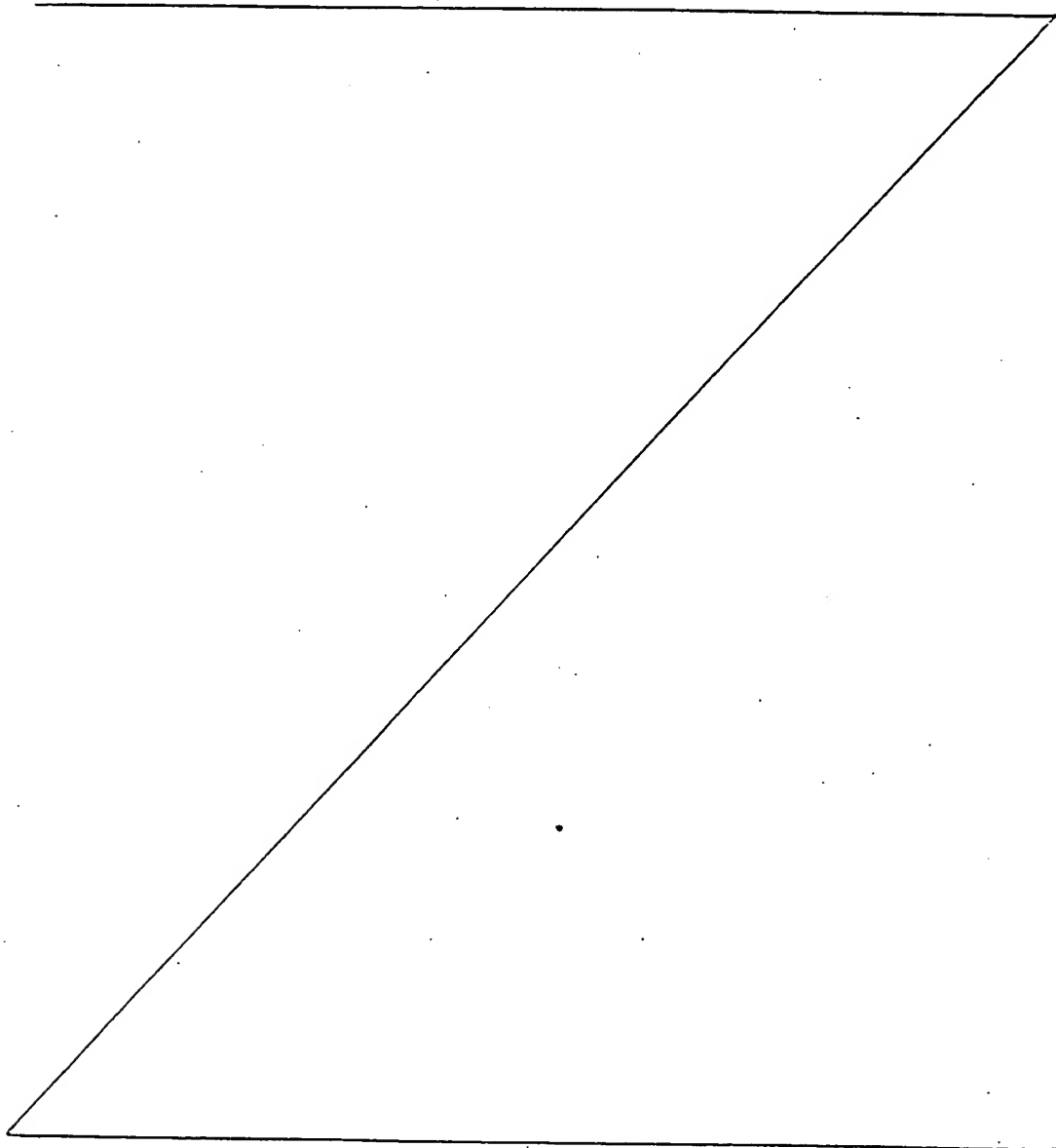
Final

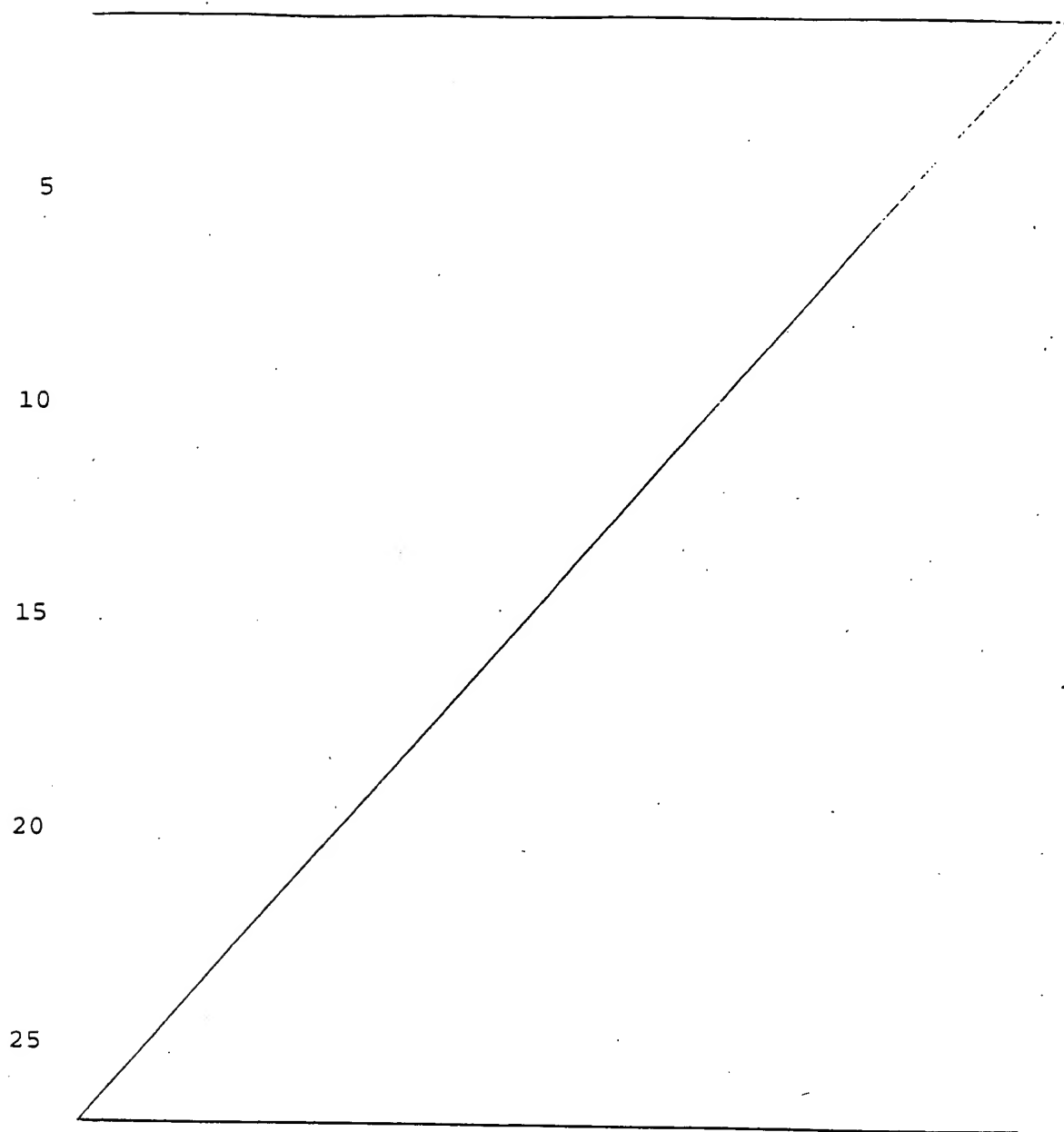
bFGF	from 1 to 20 ng/ml
a-SCF	from 0.5% to 2% vol COS SN/vol
IGF-1	from 5 to 50 ng/ml
LIF	from 1000 to 5000 U/ml of purified form, approximately equivalent to from 0.1% to 2% vol/vol of culture supernatant of transfected COS cells

- IL-6 from 5 to 50 ng/ml (approximately from 0.1% to 2% vol/vol of culture supernatant of transfected COS cells)
- IL-11 from 5 to 50 ng/ml (approximately from 0.1% to 2% vol/vol of culture supernatant of transfected COS cells)

Advantageously, the bFGF concentration is greater than 5 ng/ml and the IGF-1 concentration is greater than 10 ng/ml.

5





The comparison of the effect of the various cytokines is depicted in Figure 3.

30

Conclusion

The role of the cytokines LIF, IL-11 and IL-6 seems especially marked and almost equivalent in the obtaining of colonies which are positive for alkaline phosphatase activity.

35

IV) Role of a lawn of feeder cells

In mice, the growth of some ES cells requires the presence of a lawn of feeder cells. The effect of these cells on the bird embryo cells was tested.

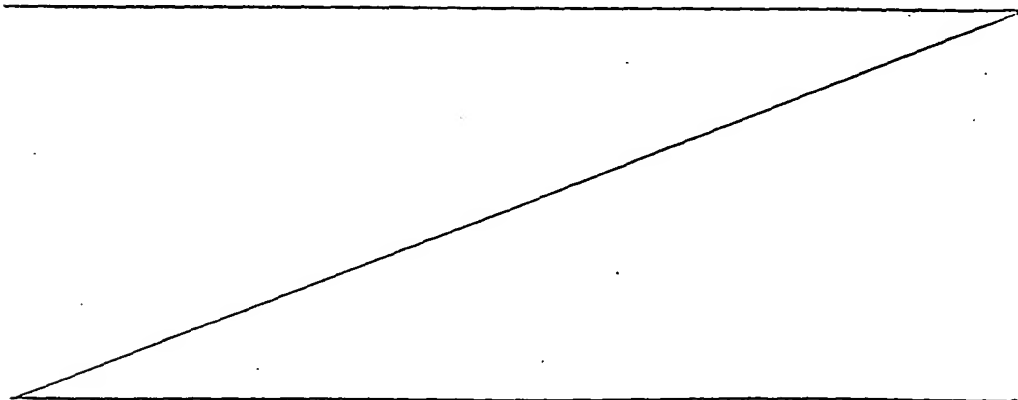
The cells are inoculated in complete ESA medium with growth factors aSCF (avian stem cell factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor-1) and ARMA antibody (1 μ g/ml), comparatively either onto a gelatin base or onto a lawn of mitomycin C-treated STO cells, as described in the Materials and Methods section. After three days of culture, a further inoculation is added to the culture. The cytokines CNTF (ciliary neurotrophic factor), OSM (oncostatin M), LIF (leukemia inhibitory factor), IL-11 (interleukin 11) and IL-6 (interleukin 6) are added to the medium at the concentrations stated above.

Figure 4A depicts cell growth on gelatin in the presence of various cytokines. Figure 4B depicts cell growth on a lawn of feeder cells in the presence of the same cytokines.

Conclusion

The number of colonies derived from the blastoderm cells and displaying alkaline phosphatase activity is very markedly increased in the presence of a lawn of feeder cells (approximately 4- to 5-fold), with a

30



Monoclonal antibody	Undifferentiated	Differentiated
ECMA-7	+++++	-
SSEA-1	+++++	-
SSEA-3	+++	-
TEC-01	+++++	-
TEC-02	+	+++
TEC-03	++	++
EMA-1	++++	+
EMA-6	+++	+
TROMA-1	-	++++
NC-1	++++	+
HNK-1	++++	+

NC-1 and HNK-1 recognize the same epitopes (Tucker et al. 1984)

5 SSEA-1 and TEC 01 recognize the same epitopes

It is apparent that the expression of ECMA-7 (Kemler et al. (1981)) is the largest, suggesting a genuine ES cell nature, and that TEC-01 (Draber et al. (1987b)) and SSEA-1 (Solter and Knowles (1978)) recognize the same epitopes on undifferentiated cells exclusively. Conversely, the increase in expression of TEC-02 (Draber et al. (1987a)) may, along such lines, indicate an induced or spontaneous state of differentiation. The completion of this loss of ES nature is characterized by the strong expression of TROMA-1 (Brulet et al. (1980)), present only on the differentiated cells. Hence this set of antibodies enables a picture to be built up regarding the state of differentiation of a culture. Antibodies such as TEC-03 (Draber et al. (1987a)) are seen to be relatively indifferent to the marked state of differentiation.

It should, moreover, be stressed that, hitherto, neither ECMA-7 nor SSEA-1, SSEA-3, TEC-01, TEC-02, TEC-03 or TROMA-1 have been the subject of a publication demonstrating the reactivity on sections, 5 cells or any material of avian origin.

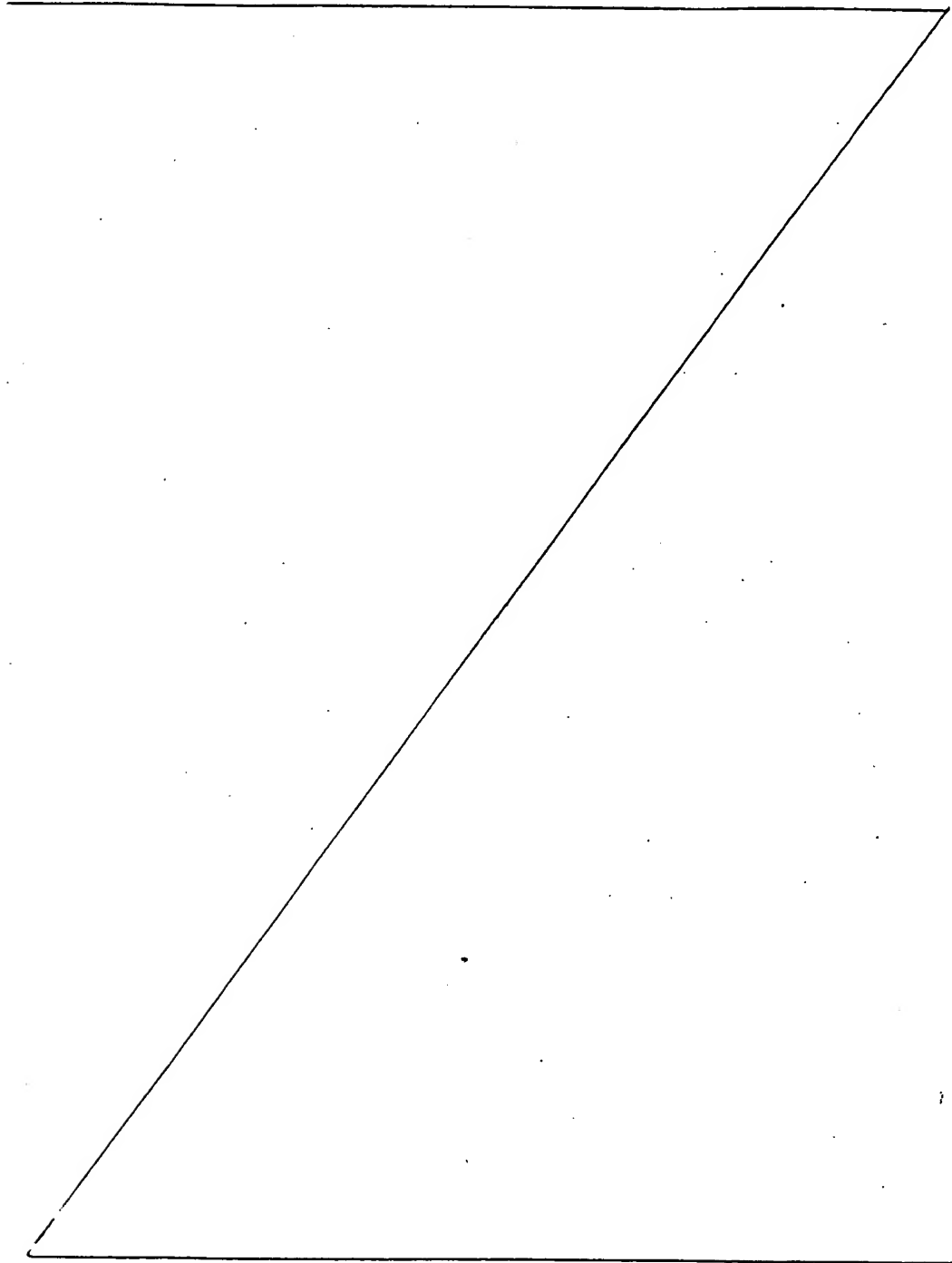
Conclusion

Among the antibodies tested, some, such as ECMA-7 (Kemler et al. (1981)), SSEA-1 (Solter and 10 Knowles (1978)), SSEA-3 (Shevinsky et al. (1982)), are characteristic of murine "ES" cells. These antibodies recognize cells which are hence potentially totipotent in avian cultures. The same observations having been obtained with either quail or hen cultures. [sic] Other 15 antibodies, such as EMA-1 (Hahnel and Eddy (1986)), NC-1 and HNK-1 (Obo and Balch (1981)), are known to recognize avian epitopes (and murine in the case of EMA-1, Urven et al. (1988)) of highly undifferentiated cells, and are hence also capable of recognizing a 20 profile of avian stem cells.

VI) Subculturing of the cells

Quail or chicken blastoderm disk cells are 25 inoculated onto a lawn of STO feeder cells. After various days of culture, the cells are subcultured on a lawn of STO cells as described in Materials and Methods. The detection of cells and clumps which are positive both for alkaline phosphatase activity and for 30 the colocalization of a labeling by ECMA-7 or NC-1 suggests that the culture conditions are defined for maintaining cells having totipotent character in the secondary and tertiary cultures. The process of subculturing brings about, moreover, once the first 35 passage has been completed, a homogeneity in the whole of the culture, both morphologically and by the detection of the various epitopes. The clumps of cells become widely spread and homogeneous, a character enhanced by the large capacity of these cells to divide

rapidly, in contrast to the differentiated cells present initially in the primary culture. To date, these identification and characterization criteria may be used and detected for at least 5 weeks after the inoculation.



A number of animals were obtained in this way and show an apparent degree of chimerism, phenotypically detectable by the plumage marker used and characteristic of the strain of cells derived from the donor strain, varying from 5% to 90%. This chimerism can, until now, be obtained equally well with cells derived from primary, secondary or tertiary cultures. It should be noted that the percentages of chimeric animals and the degrees of chimerism of these animals do not vary substantially according to the time of culture of the injected cells. This further emphasizes the capacity of the medium and of the method described to maintain cells with a totipotent character.

15

Example: uninjected control animal (Fig. 7A)

Animal No. 1786-1787 showing a low degree of chimerism (5-10%)

20 Animal No. 1782-1783 showing a moderate degree of chimerism (50%)

Animal No. 1740-1741 showing a high degree of chimerism (90%)

25 These animals are presented in Figures 7B to 7D.

REFERENCES

- Brulet et al. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 4113.
- 5 Draber et al. (1987a). Cell Differentiation 21, 119.
- Draber et al. (1987b). Cell Differentiation 21, 227.
- Eyal Giladi and Kovak (1976), Developemental Biology,
10 49, 321-337
- Hahnel and Eddy (1986). Gamete Research 15, 25.
- Kemler et al. (1981). J. Embryo. Exp. Morph. 64, 45.
15
- Obo and Balch (1981). J. Immunology 127, 1024.
- Petitte et al. (1990) Development 108, 185-189
- 20 Solter and Knowles (1978). Proc. Natl. Acad. Sci. 75,
5565.
- Shevinsky et al. (1982). Cell 30, 697.
- 25 Tucker et al. (1984). Cell Differentiation 14, 223.
- Urven et al. (1988). Development 103, 299.

CLAIMS

1. Culture medium for avian totipotent embryonic
5 cells, of the type containing an avian cell culture
medium, characterized in that it contains components
supplementary to said avian cell culture medium, said
supplementary components being chosen from the group
comprising: cytokines, fibroblast growth factors,
10 insulin-like growth factors and stem cell growth
factors,
and in that it is substantially free from active
retinoic acid.
2. Culture medium according to claim 1,
15 characterized in that it comprises anti-retinoic acid
antibodies (ARMA).
3. Culture medium according to claim 1 or 2,
characterized in that the cytokine is chosen from LIF
(leukemia inhibitory factor), IL-11 (interleukin-11),
20 IL-6 (interleukin-6), CNTF (ciliary neurotrophic
factor), oncostatin M (OSM) and mixtures thereof.
4. Culture medium according to one of claims 1 to
3, characterized in that it contains at least one
cytokine chosen from the group consisting of LIF, IL-
25 11, IL-6, and the various mixtures thereof.
5. Culture medium according to one of claims 1 to
4, characterized in that it contains a fibroblast
growth factor which is b-FGF (basic fibroblast growth
factor).
- 30 6. Culture medium according to one of claims 1 to
5, characterized in that it contains an insulin-like
growth factor which is IGF-1 (insulin-like growth
factor-1).
7. Culture medium according to one of claims 1 to
35 6, characterized in that it contains a stem cell growth
factor chosen from a-SCF (avian stem cell factor) and
m-SCF (murine stem cell factor).

8. Culture medium according to one of claims 1 to 7, characterized in that it contains a lawn of feeder cells.

9. Culture medium according to one of claims 1 to 8, characterized in that it has the following composition:

BHK-21	
Fetal bovine serum	10% (vol/vol)
Chicken serum	2% (vol/vol)
Conalbumin	20 ng/ml
Nonessential amino acids	1% (vol/vol)
Sodium pyruvate	1 mM
Nucleoside stock	1% (vol/vol)
Hepes (1 M)	10 mM
β -Mercaptoethanol	0.2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 μ g/ml
Gentamicin	10 ng/ml

Additives:

10

Final

bFGF	from 1 to 20 ng/ml
a-SCF	from 0.5% to 2% vol COS SN/vol
IGF-1	from 5 to 50 ng/ml
LIF	from 1000 to 5000 U/ml of purified form
IL-6	from 5 to 50 ng/ml
IL-11	from 5 to 50 ng/ml

with the nucleoside stock consisting of the mixture:

adenosine	80 mg
guanosine	85 mg
15 cytidine	73 mg
uridine	73 mg
thymidine	24 mg
H ₂ O	100 ml

and Cos SN representing a culture supernatant of COS-7 cells transfected for transient expression with a vector for the expression of the cDNA of the factor in question.

5 10. Method of culture of avian totipotent embryonic cells (or avian ES cells), characterized in that:

- a) cells originating from blastoderm disks of fertilized eggs are suspended in an avian cell culture medium comprising, in addition, at least
10 one compound chosen from cytokines, fibroblast growth factors, insulin-like growth factors and stem cell growth factors, and in which the retinoic acid is substantially inactivated,
b) a lawn of feeder cells is inoculated with the
15 suspension obtained after step a),
c) the cells are incubated for a specified period,
d) the cells in culture are removed and purified so as to recover bird ES cells.

11. Method according to claim 10, characterized in
20 that, between steps c) and d), one or more additions of fresh medium identical to the one used in step a) are performed at intervals of time.

12. Method according to either of claims 10 or [sic] 11, characterized in that the medium of step a)
25 contains the following components: b-FGF, a-SCF, IGF-1, LIF, IL-11, IL-6 and anti-retinoic acid antibodies.

13. Method according to one of claims 10 to 12, characterized in that the medium of step a) contains, in addition, the following compounds:

30

- . Fetal bovine serum
- . Chicken serum
- . Conalbumin
- . Nonessential amino acids
- 35 . Sodium pyruvate
- . Nucleoside stock
- . Hepes (1M)
- . β -Mercaptoethanol
- . Penicillin

- . Streptomycin
- . Gentamicin

with the nucleoside stock consisting of the mixture:

- 5 adenosine, guanosine, cytidine, uridine and thymidine
in aqueous solution.

14. Method according to one of claims 11 to 13,
characterized in that, between steps c) and d), the
10 addition of fresh medium is performed on day 3 and then
every day.

15. Method according to one of claims 10 to 14,
characterized in that step d) is performed by enzymatic
treatment, washing in a medium not containing any
15 growth factor and centrifugation.

16. Method according to one of claims 10 to 15,
characterized in that, after step d), a step e) is
performed in which the ES cells are reinoculated onto a
lawn of feeder cells, in the presence of medium
20 according to claim 1, so as to obtain a secondary
culture.

17. Method according to claim 16, characterized in
that the steps d) and e) are repeated several times.

18. Method according to one of claims 10 to 17,
25 characterized in that the lawn of feeder cells consists
of mitomycin-treated or irradiated STO cells.

19. In vitro culture of avian ES cells which is
capable of being obtained by the method according to
one of claims 10 to 18.

30 20. Modified avian totipotent embryonic cell,
characterized in that it can be obtained by integration
of the gene coding for a heterologous protein in the
genome of an avian ES cell in culture.

21. Transgenic animal obtained at least partially
35 from [lacuna] embryonic cell according to claim 20.